

**Enzymkatalyse in
verschiedenen Formen der lichtabhängigen
NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Chemikerin Sonja Fey
geboren am 04. November 1982 in Eschwege

Gutachter:

PD Dr. Gudrun Hermann, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Prof. Dr. Ralf Oelmüller, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Prof. Dr. Sven Rau, Universität Ulm

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14. Oktober 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Die lichtabhängige NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR) - ein Schlüsselenzym der Chlorophyllbiosynthese	5
1.2	Die primären Photoprozesse bei der Enzymkatalyse in der POR	8
1.3	Zielstellung	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Präparation von Protochlorophyllid a (PChlide) aus etioliertem Hafer (<i>Ave- na sativa</i> L.)	14
2.1.1	Isolierung des PChlides	14
2.1.2	Aufreinigung des PChlides	14
2.1.3	Charakterisierung des PChlides	15
2.2	Präparation der POR A und POR B aus Gerste (<i>Hordeum vulgare</i> L.) . .	15
2.2.1	Transformation der Plasmid-DNA der POR-Enzyme in <i>E. coli</i> M15- Zellen	15
2.2.2	Erzeugung und Transformation der Plasmid-DNA der POR A- und POR B-Mutanten	17
2.2.3	Überexpression der POR-Enzyme	18
2.2.4	Isolierung und Aufreinigung der POR-Enzyme	19
2.2.5	Charakterisierung der POR-Enzyme	20
2.3	Bestrahlung des PChlide-POR-NADPH-Komplexes	21
2.4	Spektroskopische Methoden	22
2.4.1	Stationäre UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie	22
2.4.2	Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie	22
2.4.3	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie	23
2.4.4	Zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie	24
2.4.5	NMR-Spektroskopie	25
3	Ergebnisse und Diskussion	26
3.1	Primäre Reaktionsdynamik des Enzymsubstrates PChlide in Lösung und bei Bindung an die POR A	26
3.1.1	Spektroskopische Charakterisierung und primäre Reaktionsdyna- mik von PChlide in Lösung	26

3.1.2	Analyse der lichtinduzierten Primärprozesse im PChlide anhand von zeitabhängigen Frequenzverschiebungen in der C(13')=O Carbonylschwingungsmode	32
3.1.3	Primäre Photoprozesse des PChlides bei Bindung an die POR A . .	37
3.2	Vergleich von POR A, POR B und POR ss im Hinblick auf funktionelle und evolutionäre Unterschiede	46
3.2.1	Homologien in der Primärstruktur von POR A, POR B und POR ss	47
3.2.2	Die NADPH-Bindedomäne von POR A, POR B und POR ss - die Abstände zwischen dem Cofaktor NADPH und einem benachbarten Tryptophan als Kriterium für Analogien in der Tertiärstruktur . . .	48
3.2.3	Michaeliskonstanten für die Bindung von PChlide und NADPH an die POR A, POR B und POR ss	52
3.2.4	Reaktionsquantenausbeute in der POR A, POR B und POR ss als Funktion der Anregungswellenlänge	60
62		
3.2.5	Auswirkungen von Punktmutationen in der PChlide-Bindungstasche auf die Enzymaktivität der POR A und POR B	69
4	Zusammenfassung	77

1 Einleitung

1.1 Die lichtabhängige NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR) - ein Schlüsselenzym der Chlorophyllbiosynthese

Die NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR, EC 1.3.1.33) ist ein Schlüsselenzym in der lichtabhängigen Chlorophyllbiosynthese in Angiospermen. Es katalysiert die Umwandlung von Protochlorophyllid (PChlide) zu Chlorophyllid (Chlide). In photosynthetisierenden Bakterien, Algen und Gymnospermen wird zusätzlich für diese Reaktion die lichtunabhängige Protochlorophyllidreduktase genutzt, die sich sowohl im Mechanismus als auch strukturell von der lichtabhängigen NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase unterscheidet. [1] [2]

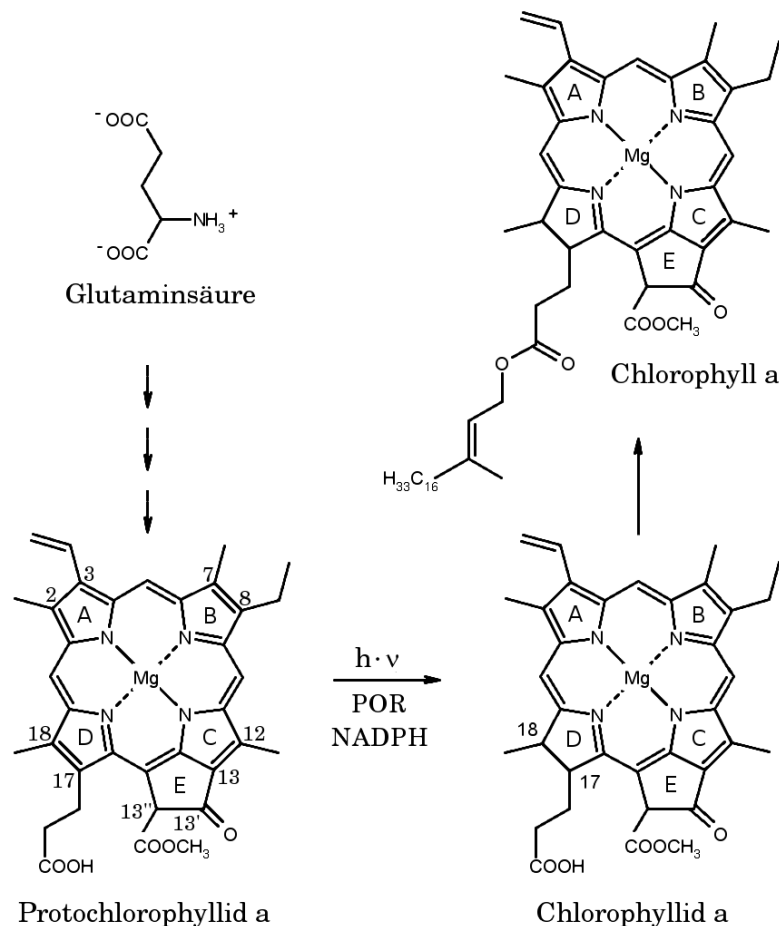


Abbildung 1: Ausschnitt aus der Reaktionsabfolge bei der Chlorophyllbiosynthese.

Abbildung 1 zeigt einen Ausschnitt von Reaktionen der Chlorophyllbiosynthese. Ausgangssubstanz ist Glutaminsäure, die in mehreren Reaktionsschritten zu Protochloro-

phyllid umgesetzt wird. Die Umwandlung von PChlide zu Chlide wird durch das Enzym POR in Gegenwart von NADPH als Cofaktor katalysiert. Ein wichtiger Aspekt dieser Reaktion ist, dass sie lichtabhängig ist und das Substrat PChlide als Photorezeptor genutzt wird. [3] Nach der Bildung von Chlide wird dieses im letzten Reaktionsschritt durch die Chlorophyllsynthase mit dem Diterpenalkohol Phytol zum Chlorophyll verestert. [1] Bei der Reaktion von PChlide zu Chlide erfolgt die Reduktion der C17-C18-Doppelbindung im Ring D des Porphyrinringsystems. Dabei wird auf der Basis bisheriger Vorstellungen das pro-S-Hydrid des Cofaktors NADPH stereospezifisch auf die Position C17 übertragen, während das C18 ein Proton von der Hydroxylgruppe eines Tyrosins in der PChlide-Bindungstasche erhält. [4] [5] [6] [7] [8] Der pKa-Wert der phenolischen Hydroxylgruppe des Tyrosins wird sehr wahrscheinlich durch ein benachbartes Lysin herabgesetzt. [9] Die Substratbindungstasche enthält als Strukturmotiv die Aminosäuresequenz Tyr-Lys-Asp-Ser-Lys. [10] Abbildung 2 stellt den postulierten Reaktionsmechanismus der enzymkatalysierten PChlide-Reduktion dar.

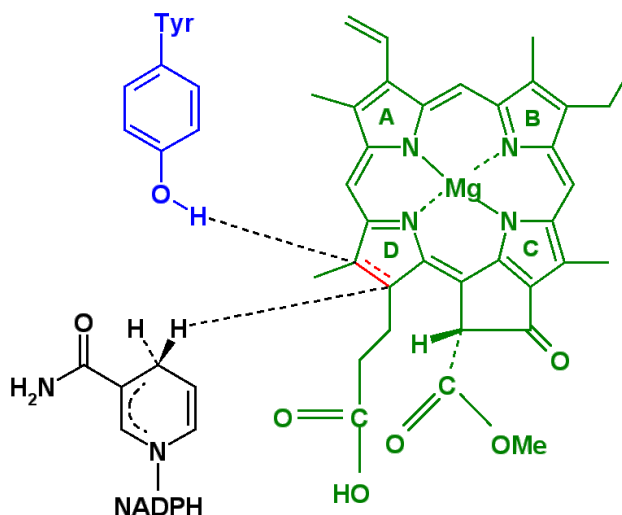


Abbildung 2: Postulierter Reaktionsmechanismus in der lichtabhängigen NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase bei der Reduktion des PChlides.

Für die Enzymaktivität ebenfalls bedeutsame Aminosäuren sind drei Cysteine. Eines dieser Cysteine, das nur einige Aminosäuren entfernt vom NADPH-Bindungsmotiv Richtung C-Terminus liegt, soll in die korrekte Einbindung des NADPHs involviert sein. [10] Von einem weiteren dieser Cysteine, das sich in direkter Nachbarschaft zur Substratbindungstasche befindet, wird angenommen, dass es an der Bindung des PChlides an das katalytische Zentrum beteiligt ist. Das dritte der Cysteine ist in einer zusätzlichen Bindungstasche lokalisiert, die eine geringere Affinität für das PChlide zeigt. Dieses PChlide spielt höchstwahrscheinlich eine Rolle bei der Ausbildung höhermolekularer POR-Komplexe.

[11] [12] Außerdem ist beobachtet worden, dass die Substitution dieses Cysteins zu einem dramatischen Verlust der Enzymaktivität führt, was einen starken Einfluss auf den Katalysemechanismus der POR nahelegt. [13]

Ebenfalls essentiell für die Enzymkatalyse sind bestimmte Struktur motive im PChlide. Dazu gehören der komplette Cyclopentanonring (Ring E), die Propionsäureseitenkette am Ring D und das komplexgebundene Zentralatom. Als Zentralmetalle im PChlide werden nur Magnesium(II)- oder Zink(II)-Ionen von der POR akzeptiert, das metallfreie bzw. Cobalt-, Kupfer- und Nickel-Analogon führt zur Inaktivität des Enzyms. [14] [15] [16] [17]

Die Molmasse der POR liegt zwischen 33 und 38 kDa. [18] Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten gehört die POR zur Familie der sogenannten *RED* Enzyme (Reduktasen, Epimerasen und Dehydrogenasen). Diese Enzymfamilie umfasst Oxidoreduktasen, die NAD(P)^+ oder NAD(P)H als Cofaktor nutzen und als Dimere oder Tetramere auftreten. [9] [10] [19] Bisher liegt keine Röntgenkristallstruktur der POR vor. Dennoch konnte auf der Basis von Sequenzhomologien zur Hydroxysteroid-Dehydrogenase ein Modell für die Tertiärstruktur der POR aus *Synechocystis* sowie der POR A und B aus Gerste aufgestellt werden. [10] [12] Danach ist das Bindungsmotiv Gly-Ala-Ser-Ser-Gly-x-Gly für die Einbindung des NADPHs verantwortlich. Im Gegensatz zu den Dehydrogenasen existiert in der POR eine zusätzliche Aminosäureregion, die die Assoziation mit der Lipidmembran bewirken soll, eventuell aber auch an der Ausbildung höhermolekularer POR-Komplexe beteiligt ist. [20] [21]

Der ternäre Komplex aus POR, PChlide und NADPH bildet sich in den Prolamellarkörpern der Etioplasten. [22] [23] In Angiospermen sind drei Isoformen der POR bekannt, die POR A, POR B und POR C. Die POR C wurde bislang nur in *Arabidopsis thaliana*, die auch zusätzlich die POR A und POR B nutzt, nachgewiesen und soll eine photoschützende Rolle während der Ergrünungsphase übernehmen. [24] [25] [26]

Die Isoenzyme POR A und POR B kontrollieren in einer licht- und NADPH -abhängigen Reaktion die Chlorophyllbiosynthese. Beide sind bereits in den Prolamellarkörpern der Etioplasten zu finden. Die POR A dominiert aber vor allem in im Dunkeln angezogenen (etiolierten) angiospermen Pflanzen und ist beim Übergang vom Etiolement zum Deetiolement aktiv. Im Licht erweist sich die POR A als sehr viel instabiler. Sowohl die Enzymaktivität als auch das mRNA- und Proteinlevel nehmen dramatisch ab. Die POR B wird dagegen konstitutiv exprimiert. Sie ist sowohl in der Ergrünungsphase als auch in bereits lichtadaptierten angiospermen Pflanzen aktiv und repräsentiert damit das Enzym, das während des gesamten Lebenszyklus einer angiospermen Pflanze für die lichtabhängige Chlorophyllsynthese verantwortlich ist. [26] [27] [28] [29] [30] Beide Enzyme werden

als inaktive Vorstufen im Cytosol synthetisiert und über eine entsprechende Transitsequenz in die Plastiden importiert. Hinsichtlich des Transportmechanismus unterscheiden sich die POR A und POR B voneinander. Die Translokation der POR B erfolgt über den bekannten TIC/TOC (*translocon of the inner/outer chloroplast envelope membrane*) Mechanismus. Die POR A wird im Unterschied dazu über einen speziellen Translokationskomplex, den PTC-Komplex (*protochlorophyllide-dependent translocon complex*), in die Plastiden befördert. Dieser Transportmechanismus erfordert, dass sich PChlide in den Plastiden bereits akkumuliert hat. [11] [31] [32]

Nach Reinbothe et al. bilden die POR A und POR B in den Prolamellarkörpern der Etioplasten Lichtsammelkomplexe (*light-harvesting POR-protochlorophyllide complexes*, LHPP) ähnlich den Lichtsammelantennen der Photosynthese. [33] Diese Lichtsammelkomplexe werden von größeren POR A/POR B-Aggregaten gebildet. Stöchiometrisch gesehen, bestehen diese aus einem POR B/PChlide a/NADPH-Komplex und fünf POR A/PChlide b/NADPH-Komplexen. An den Wechselwirkungen zwischen den einzelnen POR-Komplexen ist das PChlide in der oben erwähnten zusätzlichen Bindungstasche beteiligt. In der Deetiolerungsphase ist nur das an die POR B gebundene PChlide a photoaktiv. Das mit der POR A assoziierte PChlide b sammelt dagegen das Licht und überträgt die Energie auf das PChlide a, das sich dann zu Chlide a umsetzt. Bei der Umwandlung der Etioplasten in die Chloroplasten und damit dem Abbau der Prolamellarkörper wird die POR A aktiv und es entsteht Chlide b bevor die Expression der POR A abnimmt. Der Energietransfer vom PChlide b auf das PChlide a und die Reaktion vom PChlide a zum Chlide a soll dafür sorgen, dass keine angeregten Triplettzustände in diesem Schritt der Chlorophyllbiosynthese entstehen können. Infolgedessen kann kein Singulett-Sauerstoff oder andere reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden. Auf der Basis dieses Modells scheint die POR A eine Schutzfunktion während des Ergrünungsprozesses angiospermer Pflanzen zu besitzen. [12] [31] [33] [34]

1.2 Die primären Photoprozesse bei der Enzymkatalyse in der POR

Die für eine chemische Reaktion erforderlichen Bindungsbrüche, Neuknüpfungen, Protonen- und Elektronentransfers, etc. laufen in einem Zeitbereich ab, in dem quantenmechanische Bewegungen von Atomkernen und Elektronen stattfinden. Dieser Zeitbereich liegt zwischen einigen hundert Femto- bis hin zu einigen zehn Pikosekunden. Um solche ultraschnellen Prozesse in Echtzeit verfolgen zu können, bedarf es Methoden, die eine entsprechend hohe Zeitauflösung zulassen. Eine gegenwärtig häufig praktizierte Methode ist

die der zeitaufgelösten Spektroskopie. Hier wird die Reaktion durch einen ultraschnellen Laserpuls ausgelöst und nachfolgende Änderungen in der Absorption über einen weiten spektralen Bereich mit Hilfe geeigneter Detektionstechniken verfolgt. Anschließend werden die beobachteten Absorptionsänderungen mit Änderungen in der molekularen Struktur in Verbindung gebracht. In Abhängigkeit von der zeitlichen Verzögerung zwischen Anregungs- und Abfragepuls sind so quasi Schnappschüsse der ablaufenden chemischen Reaktion zu erlangen. [35] [36]

Aus den folgenden Gründen ist diese Methode besonders gut geeignet, um die primären Reaktionsschritte in der POR aufzuklären. (i) Der Enzym-Substrat-Komplex bildet sich im Dunkeln, so dass Diffusionsprozesse, die dessen Bildung vorausgehen, nicht stören. [22] (ii) Die enzymatische Aktivität wird durch die Absorption eines Lichtpulses ausgelöst und somit der Nullpunkt der Reaktion auf der Zeitskala festgelegt. Die POR erweist sich damit als ein interessantes Modell, um Einblicke in die primären Reaktionsabläufe einer enzymkatalysierten Reaktion im Echtzeitbereich zu gewinnen. Dementsprechend liegen bereits erste Ergebnisse vor, die auf der Basis von zeitaufgelösten Absorptionsmessungen einen Einblick in den Reaktionsmechanismus der POR vermitteln. [37] [38]

Diese Untersuchungen, ausgeführt an einem POR-Enzym aus Cyanobakterien, zeigten, dass die Bildung des Chlides über zwei parallele Wege erfolgt, zum Einen über einen konzertierten H^+/H^- -Transfer innerhalb von 3 ps und zum Anderen über einem sequentiellen Weg. Dabei wird das Proton innerhalb von 3 ps und nachfolgend das Hydrid innerhalb von 400 ps übertragen. Abbildung 3 stellt diesen Reaktionsmechanismus dar. [37]

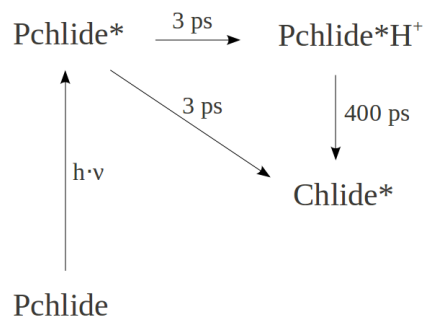


Abbildung 3: Reaktionsmechanismus für die Reduktion des PChlides zum Chlide durch die POR aus einem Cyanobakterium anhand erster zeitaufgelöster Absorptionsmessungen. [37]

Aus weiterführenden Untersuchungen leitet sich das in Abbildung 4 dargestellte Modell ab. [38] Danach wurden zwei Populationen des POR-Enzyms identifiziert, von denen die eine zunächst inaktiv und die andere aktiv ist. Die inaktive Population zeigt eine Photochemie, die der des nicht enzymgebundenen Substrats entspricht. Die Anregung mit einem 475 nm-Puls führt zur Besetzung des Franck-Condon-Zustandes ($PChlide^{*I}$), der

über einen primären angeregten S_1 -Zustand (PChlide^{*I}) in einen sekundären angeregten S_1 -Zustand (PChlide^{*II}) übergeht. Dieser relaxiert dann schließlich in den Grundzustand zurück. Die aktive Population zeigt dieselbe Photochemie, aber aus allen drei angeregten Zuständen wird ein Intermediat I_{675} gebildet. Es wird angenommen, dass in dem Intermediat I_{675} das PChlide-Molekül Wasserstoffbrückenbindungen zur Proteinumgebung und/oder zum NADPH ausbildet und dadurch stabilisiert wird. Aus weiteren experimentellen Befunden wurde der Schluss gezogen, dass der POR-Komplex zunächst durch Absorption eines Photons aktiviert wird, während ein zweites Photon dann die Enzymkatalyse, die zur Bildung des Chlides führt, initiiert. Diese Reaktion läuft mit einer Quantenausbeute von 0,3 ab.

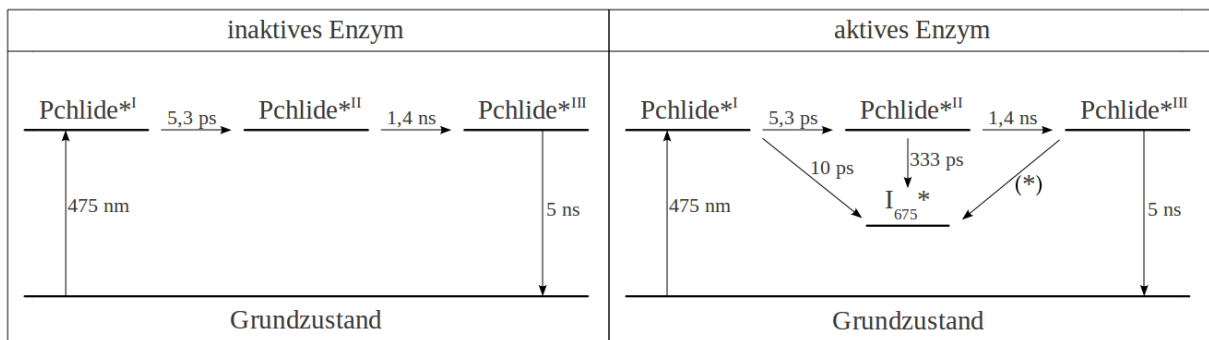
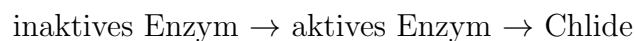


Abbildung 4: Termschema für die primären Reaktionsschritte in der POR. Dargestellt sind die Prozesse im inaktiven und im aktiven Enzym, wie sie aus zeitaufgelösten Absorptionsmessungen an einer POR aus Cyanobakterien abgeleitet wurden. (*) Die Zeitkonstante für die Bildung des Intermediats konnte aufgrund des Messzeitfensters nicht bestimmt werden. [38]

Zeitaufgelöste Infrarot-Untersuchungen im Sekundenbereich bestätigen, dass die Absorption des ersten Photons Konformationsänderungen im Enzym-Substrat-Komplex bewirkt, die das Enzym von einer inaktiven in eine aktive Form überführen. Diese Schlussfolgerung stützt sich auf die folgenden aus dem Experiment gewonnenen Beobachtungen. Der elektronischen Anregung des PChlide-POR-NADPH-Komplexes durch einen 444 nm-Laserpuls folgt zunächst eine Änderung in den Amplituden der Amid I- und Amid II-Bande, die auf Konformationsänderungen im Apoprotein hinweisen. Erst im weiteren Zeitverlauf wird eine Intensitätsabnahme in den für das PChlide spezifischen IR-Banden, wie in der für die Carbonylstreckschwingung, sichtbar. Parallel dazu nimmt die Intensität der für das Chlide charakteristischen IR-Banden, wie die der Valenzschwingung der Kohlenstoffeinfachbindung, zu. Auf der Basis dieser Erkenntnisse wird das folgende sequentielle Modell postuliert:



Als Alternative zur methodisch anspruchsvollen zeitaufgelösten spektroskopischen Technik wurden auch Tieftemperaturuntersuchungen an einer POR aus Cyanobakterien durchgeführt. [39] [40] [41] Durch tiefe Temperaturen lassen sich chemische Prozesse „quasi einfrieren“ und die intermediären Zustände, die sich bei Raumtemperatur der Beobachtung entziehen, charakterisieren.

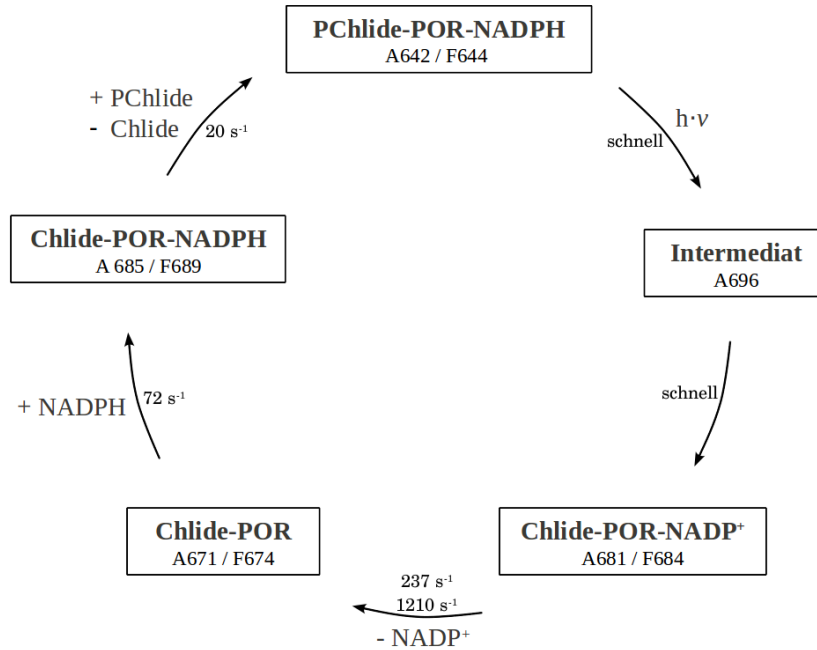


Abbildung 5: Katalysezyklus der POR aus *Thermosynechococcus elongatus* ermittelt durch spektroskopische Untersuchungen bei tiefen Temperaturen. A und F sind dabei die charakteristischen Absorptions- bzw. Fluoreszenzmaxima der jeweils betrachteten Intermediate. Außerdem sind die Geschwindigkeitskonstanten für die einzelnen Prozesse dargestellt, die mittels Laserblitzlichtspektroskopie in einem Zeitbereich von Millisekunden bis hin zu einigen Sekunden bestimmt wurden. [40] [42] [43]

Durch Anregung des ternären PChlide-POR-NADPH-Komplexes mit Weißlicht bei 77 K und die Registrierung der Absorptions- und Fluoreszenzspektren nach anschließender schrittweiser Erhöhung der Temperatur auf 330 K, konnten vier Intermediate charakterisiert werden. Abbildung 5 zeigt den aus diesen Untersuchungen resultierenden Mechanismus. Danach bildet der ternäre Komplex mit einem Absorptions- bzw. Fluoreszenzmaximum bei 642 nm bzw. 644 nm ein Intermediat I_{696} , das offenbar dem in den zeitaufgelösten Messungen beobachteten Intermediat I_{675} zu entsprechen scheint. I_{696} ist nicht fluoreszent und soll einen Charge-Transfer-Zustand repräsentieren, der aus dem Hydridtransfer vom NADPH auf die Position C17 des PChlides resultiert. [43] [44] Dieser eigentlichen Lichtreaktion folgen vier Dunkelreaktionen. Im Verlauf der ersten Dunkelreaktion wird PChlide zu Chlide unter Bildung des Chlide-POR-NADP⁺-Komplexes reduziert. Daraus entsteht durch die Abgabe des oxidierten Cofaktors NADP⁺ der Chlide-POR-Komplex,

dessen Absorptions- und Fluoreszenzmaximum im Vergleich zum Chlide-POR-NADP⁺-Komplex blauverschoben ist. Erst nach der erneuten Bindung des reduzierten Cofaktors NADPH im Chlide-POR-NADPH-Komplex dissoziiert das Reaktionsprodukt Chlide vom Enzymkomplex ab. Die erneute Einbindung des PChlides führt dann zum Start eines neuen Reaktionszyklus.

1.3 Zielstellung

Aus den Erläuterungen im einleitenden Kapitel geht hervor, dass in der POR die Enzymkatalyse durch Lichtabsorption initiiert wird. Aufgrund dieser Eigenschaft ist die POR besonders gut geeignet, um die Reaktionsdynamik einer enzymkatalysierten Reaktion durch Anwendung zeitaufgelöster spektroskopischer Techniken im Echtzeitbereich zu verfolgen und aufzuklären. Von den in der Natur vorkommenden Enzymen kann neben den POR-Enzymen die enzymatische Aktivität durch Absorption von Licht nur noch in den Photolyasen ausgelöst werden.

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit bestand darin, einen Beitrag zum besseren Verständnis der Primärprozesse zu leisten, die bei der Enzymkatalyse in der POR ablaufen. Zur Realisierung dieser Zielstellung sollten zwei Wege eingeschlagen werden:

- Zum einen sollte der Einfluss der Femtosekundendynamik auf die Primärprozesse der Enzymkatalyse in einem pseudoternären Komplex, in dem der Cofaktor NADPH durch NADP⁺ substituiert wurde, untersucht werden. Mit diesem Modellsystem war beabsichtigt, die initialen Photoprozesse zu analysieren, die der eigentlichen Reduktion vorausgehen, aber die Bildung des Übergangszustandes einschließen.
- Zum anderen sollte das katalytisch aktive Zentrum des POR-Enzyms durch Punktmutationen gezielt verändert werden, um so die für die Enzymkatalyse essentiellen Wechselwirkungsseiten in der Substratbindungstasche zu identifizieren und damit weitere Erkenntnisse über den Katalysemechanismus zu gewinnen.

Darüber hinaus wurde das Ziel verfolgt, in die Untersuchungen neben der POR A, dem vorwiegend in der Deetiolierungsphase aktiven Enzym, die POR B, das primär im Licht aktive Enzym, sowie eine POR aus Cyanobakterien (POR ss) einzubeziehen. Da Cyanobakterien als phylogenetischer Vorläufer aller Organismen mit lichtabhängiger Chlorophyllbiosynthese anzusehen sind, sollte auf diese Weise ein Einblick in die Prinzipien der Enzymkatalyse auf verschiedenen Stufen der Evolution gewonnen werden. Aus dem Vergleich von POR A und POR B sollten des Weiteren Unterschiede im Katalysemechanismus der beiden Enzyme, die möglicherweise ihre verschiedenen physiologischen Funktionen erklären, identifiziert werden.

Das Anliegen im ersten Teil der vorliegenden Arbeit bestand zunächst darin, das auf der Basis vorausgegangener Arbeiten entwickelte Modell zur Beschreibung der Reaktionsdynamik im nicht enzymgebundenen PChlide durch die Verfolgung von Strukturänderungen in zeitaufgelösten transienten Absorptionsmessungen im IR-Bereich zu verifizieren. Durch Beobachtung der Primärprozesse im pseudoternären PChlide-POR-NADP⁺-Komplex sollte dann in zeitaufgelösten Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen festgestellt werden, wie die Proteinumgebung die Reaktionsdynamik des enzymgebundenen PChlides beeinflusst und möglicherweise die Selektivität der Enzymkatalyse steuert.

Im zweiten Teil sollte sich die wissenschaftliche Arbeit darauf konzentrieren, die verschiedenen POR-Enzyme im Hinblick auf mögliche lokal begrenzte Strukturunterschiede in der Cofaktor- sowie Substratbindungstasche zu untersuchen. Im ersteren Fall war geplant, die Distanz zwischen dem eingebundenen NADPH und einem benachbarten Tryptophanrest über den Förster-Resonanz-Energietransfermechanismus zu bestimmen. Zur Analyse der Substratbindedomäne sollten Kriterien wie die Bindungskonstante des Substrats und die Effektivität der Enzymkatalyse, eingeschätzt anhand der Reaktionsquantenausbeute, herangezogen werden.

In einer weiteren Zielstellung sollte zum Verständnis des Zusammenhangs von Enzymkatalyse und deren Beeinflussung durch spezifische Substrat/Protein-Wechselwirkungen in der Substratbindungsseite beigetragen werden. Zur Realisierung dieser Strategie war durch Einführung von Punktmutationen im aktiven Zentrum die Substitution von Aminosäuren geplant, die sowohl die polaren Eigenschaften als auch die Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen verändern.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes „Die ultraschnelle Reaktionsdynamik einer enzymkatalysierten Reaktion - eine Analyse der lichtinduzierten Primärprozesse bei der Enzymkatalyse in der NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase“ angefertigt. Dieses Projekt ist ein Gemeinschaftsprojekt mit dem Institut für physikalische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse zur Reaktionsdynamik in der POR sind im Rahmen einer engen Zusammenarbeit mit diesem Institut entstanden.

Die Ergebnisse der zeitaufgelösten IR-Messungen sind das Resultat einer weiteren wissenschaftlichen Zusammenarbeit mit dem Fachbereich Physik der Technischen Universität Kaiserslautern.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation von Protochlorophyllid a (PChlide) aus etioliertem Hafer (*Avena sativa* L.)

2.1.1 Isolierung des PChlides

Die Isolierung erfolgte durch Modifizierung der von M. Helfrich et al. bzw. W. Griffiths et al. veröffentlichten Methode. [14] [45]

Verwendet wurden etiolierte Haferkeimlinge, die sechs Tage lang unter Lichtausschluss gewachsen waren. Diese wurden 48 h mit einer Lösung aus 10 mM Aminolävulinsäure in 35 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (pH 6,5) inkubiert. Da Aminolävulinsäure ein wichtiges Ausgangsprodukt der Chlorophyllbiosynthese ist, lässt sich auf diese Weise die Ausbeute an PChlide erhöhen. 1,6 kg der Haferkeimlinge wurden anschließend mit 600 ml eines 10 mM Tricin/KOH-Puffers (pH 7,5) und 300 ml Aceton in einem Mixer homogenisiert und nach der weiteren Zugabe von 1,5 l Aceton 20 min bei 4 °C gerührt. Nach der Zentrifugation bei 11.000 rpm und 4 °C für 20 min wurden jeweils 800 ml des Überstandes mit 800 ml Ether ausgeschüttelt. Die abgetrennte Etherphase wurde mit 800 ml Hexan versetzt und das Volumen der Ether/Hexan-Lösung bestimmt. Das PChlide wurde in $\frac{1}{10}$ dieses Volumens an ammoniakalischer Methanollösung (1 Teil 0,01 M NH_3 -Lösung und 4 Teile Methanol) überführt und die methanolische Phase fünfmal mit je $\frac{1}{10}$ -Volumen an 1:1-Ether/Hexan-Gemisch gewaschen. Nach der Volumenbestimmung der Methanolphase wurden das 1,8-fache Volumen an Wasser, das 0,6-fache Volumen an Ether und die Methanolphase in einem Scheidetrichter aufgeschichtet und das Produkt in die etherische Phase überführt. Im letzten Schritt erfolgte das Trocknen der etherischen Lösung über Natriumsulfat und das Abdampfen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer. Die Lagerung des auf diese Weise erhaltenen Protochlorophyllids erfolgte bei –20 °C unter Argonschutzatmosphäre.

Die Ausbeute betrug ~ 1 mg PChlide / 1 kg Koleoptilen.

2.1.2 Aufreinigung des PChlides

Die Aufreinigung der Rohpräparation erfolgte mittels semipräparativer HPLC (LC-8A, Shimadzu) auf einer *reversed phase* C_{18} -Säule (VYDAC, Partikelgröße: 10 μm , Porosität: 300 Å) unter Verwendung eines linearen Gradienten von 40 bis 80 % Acetonitril. Die Flußrate betrug 8 ml/min.

Die Elution des aufgereinigten PChlides erfolgte mit einer Retentionszeit von $t_R = 54$ min bzw. bei einem Anteil an Acetonitril von 67 %.

2.1.3 Charakterisierung des PChlides

Zur Charakterisierung und Überprüfung der Reinheit wurden verschiedene spektroskopische und chromatografische Methoden (Absorptions-, Fluoreszenz- und Massenspektroskopie sowie Dünnschicht- und Hochdruckflüssigkeitschromatografie) angewendet.

UV/VIS (MeOH):	$\lambda_{max}(B_y(0,0)) = 433 \text{ nm}$	$\lambda_{max}(Q_y(0,1)) = 576 \text{ nm}$
	$\lambda_{max}(B_x(0,0)) = 443 \text{ nm}$	$\lambda_{max}(Q_x(0,0)) = 603 \text{ nm}$
	$\lambda_{max}(Q_y(0,2)) = 533 \text{ nm}$	$\lambda_{max}(Q_y(0,0)) = 629 \text{ nm}$
	$\lambda_{max}(Q_x(0,1)) = 552 \text{ nm}$	

Die Bandenzuordnung erfolgte analog der Veröffentlichung von C. Houssier et al. [46]

Fluoreszenz (MeOH): $\lambda_{max} = 643 \text{ nm}$

Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_F = 0,06 \pm 0,002$

MS (Maldi/TOF): $[M-H] = 612,1 \text{ g/mol}$ (theoretische Molmasse: 613,0 g/mol)

Matrix: p-Nitroanilin

Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonics)

DC: Retentionsfaktor $R_f = 0,75$

Kieselgel 60 (Schichtdicke 200 μm , Partikelgröße 10-12 μm)

Eluent: Diethylether/Essigester/Methanol = 5:2:1

Analytische HPLC: Retentionszeit $t_R = 46,6 \text{ min}$ (66,6 % Acetonitril)

Vydac C₁₈ reversed phase (4,6x250 mm, Partikelgröße 10 μm , Porosität 300 Å), Eluent: Acetonitril/Wasser,

Gradient: 20-100 % Acetonitril, Flußrate: 0,8 ml/min.

2.2 Präparation der POR A und POR B aus Gerste (*Hordeum vulgare* L.)

2.2.1 Transformation der Plasmid-DNA der POR-Enzyme in *E. coli* M15-Zellen

Alle verwendeten Lösungen waren steril. Die DNA der POR B sowie der POR ss wurde in einer Auftragssynthese (Bio & Sell, Feucht bei Nürnberg) erzeugt und in den Vektor pQE-30 (Quiagen) mit einem His₆-tag am N-Terminus und dem Ampicillin-Resistenzgen einkloniert. Die Schnittstellen im Fall der POR B waren BamHI und HindIII, die im Fall der POR ss BamHI und SalI. Ein Plasmid mit der POR A Sequenz, die über BamHI und HindIII in den Vektor pQE-30 einkloniert war, stellte freundlicherweise Frau PD Dr. Christiane Reinbothe (Universität Bayreuth) zur Verfügung.

Die Transformation in *E. coli* M15[pREP4]-Zellen mit Kanamycinresistenz erfolgte über Elektroporation. Zunächst wurden kompetente M15 Zellen hergestellt. Dies erfolgte, indem die *E. coli* Zellen zum Wachsen in 2,5 %-igem LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0) mit 25 µg/ml Kanamycin bei 37 °C für 1,5 h geschüttelt, anschließend die daraus erhaltenen Zellen zweimal mit kaltem destillierten Wasser, einmal mit kaltem bidestillierten Wasser und einmal mit 10 %-iger kalter Glycerinlösung gewaschen wurden. Nach der Resuspension der Zellen in 10 %-iger Glycerinlösung wurden diese als 40 µl Portionen eingefroren und bei Bedarf wieder auf Eis aufgetaut. Zur Elektrotransformation wurde den kompetenten Zellen 1 µl Plasmid-DNA (50 ng/µl) zugefügt und diese anschließend mit 2500 Pulsen im Electroporator 2510 (Eppendorf) behandelt. Nach sofortiger Zugabe von 1 ml 2,5 %-igem LB-Medium wurden die Zellen bei 37 °C 1 h inkubiert und anschließend auf Agarplatten, die 1,5 %-Agar in LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Ampicillin enthielten, ausgespatelt. Nachdem die Zellen über Nacht bei 37 °C wuchsen, erfolgte das Ausstreichen der gewonnenen Einzelkolonien auf eine weitere Agarplatte, die erneute Inkubation bei 37 °C über Nacht und im Anschluss die Untersuchung auf erfolgreiche Transformation mittels Colony-PCR und Elektrophorese.

Für die Colony-PCR wurden neun verschiedene Einzelkolonien getestet, von denen je eine Zahnstocherspitze in 30 µl bidestillierten Wasser resuspendiert und 10 min bei 95 °C erhitzt wurde. Nach der Zugabe von 23 µl 2X PCR Master Mix (Fermentas) zu je 2 µl dieser Suspension erfolgte die PCR (30 s 94 °C, 30 s 54 °C, 1 min 72 °C, 35 Zyklen, Mastercycler, Eppendorf). Als Primer für die PCR dienten:

POR B: Primer 1: 5'-GCT-ACA-CCA-TCG-TGC-ACC-TTG-ATC-TGG-3',
Primer 2: 5'-CCT-TGG-TGA-TGT-ACT-TCT-GGA-ACG-3'.

POR ss: Primer 1: 5'-GAC-AAA-GGT-TGG-CAC-GTG-3',
Primer 2: 5'-GAG-TAT-CGG-CTA-CAC-AG-3'.

Anschließend wurden 3 µl Gelpuffer (10 mM Tris/HCl, 0.03 % Bromophenolblau, 60 % Glycerin, 60 mM EDTA, pH 7.6) zugefügt und die Elektrophorese in 1 %-igem Agarosegel mit 0,005 % Ethidiumbromid bei 90 V (Mini Electrophoresis Power Supply E132, Consort) durchgeführt. Als Ladder diente der GeneRulerTM DNA Ladder Mix (Fermentas). Abbildung 6 zeigt das Ergebnis der Elektrophorese nach der Colony-PCR für die POR B und die POR ss. Die Länge der Basenpaare der POR B- und der POR ss-DNA inklusive der beiden oben genannten Primer betrug 585 bp. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, enthält jede der getesteten Einzelkolonien die DNA der POR B bzw. der POR ss. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Transformation mittels Elektroporation erfolgreich verlaufen ist.

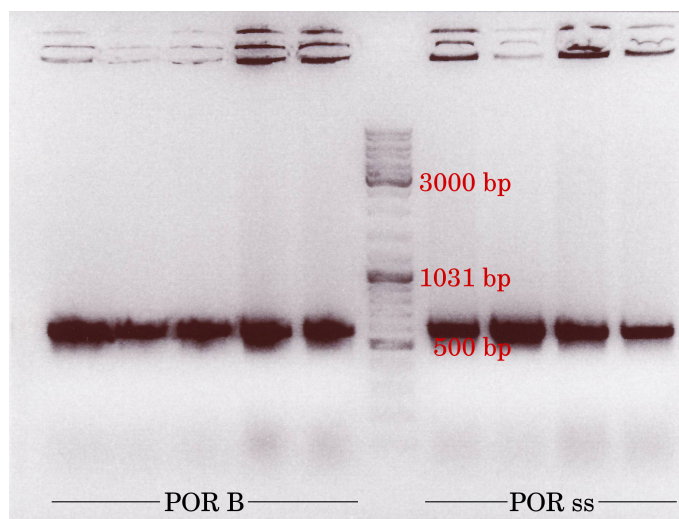


Abbildung 6: Elektropherogramm der Produkte nach der Colony-PCR. Gezeigt sind die Ergebnisse für die POR B und POR ss. Die Elektrophorese erfolgte in 1%-igem Agarosegelen bei 90 V.

Anschließend wurden Glycerinkulturen angefertigt, indem die Zellen einer Einzelkolonie zum Wachsen in 2,5 %-igem LB-Medium mit 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin über Nacht bei 37 °C inkubiert, die Suspension 1:2 mit Glycerin versetzt und in Portionen zur Lagerung bei –80 °C eingefroren wurden.

2.2.2 Erzeugung und Transformation der Plasmid-DNA der POR A- und POR B-Mutanten

Punktmutationen an der POR A	Punktmutationen an der POR B
Tyr ₂₁₅ → Phe	Tyr ₂₁₂ → Phe
Ser ₂₁₈ → Ala	Lys ₂₁₃ → Ile
Lys ₂₁₆ → Ile, Asp ₂₁₇ → Met	Asp ₂₁₄ → Met
Asp ₂₁₇ → Met, Lys ₂₁₉ → Ile	Ser ₂₁₅ → Ala
Lys ₂₁₆ → Ile, Asp ₂₁₇ → Met, Ser ₂₁₈ → Ala	Lys ₂₁₆ → Ile

Die obige Übersicht zeigt die eingeführten Mutationen. Die Codierung des Phenylalanins erfolgte durch TTT, des Isoleucins durch ATT, des Methionins durch ATG und des Alanins durch GCG. Die Punktmutationen wurden mittels *site-directed* Mutagenese (DNA-Cloning-Service, Hamburg) eingeführt. Die verwendeten Primer inklusive der durch Fettdruck hervorgehobenen mutierten Nukleotide sind in Tabelle 1 dargestellt. Die anschließende Transformation der Plasmid-DNA in *E. Coli* M15-Zellen erfolgte in gleicher Weise wie in Kapitel 2.2.1. beschrieben.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Primer bei der *site-directed* Mutagenese. Die hervorgehobenen Sequenzen zeigen die mutierten Nukleotide an.

POR (Mutation)	<i>forward</i> Primer <i>reverse</i> Primer
POR A (Phe ₂₁₅)	TAAGGACAGCAAGGTGTGCAACATGC AACGCCTTGGCGCCGTCGAA
POR A (Ala ₂₁₈)	CGAAGGTGTGCAACATGCTGACCA CGTCCTTGTACGCCTTGGCGC
POR A (Ile ₂₁₆ , Met ₂₁₇)	ATGAGCAAGGTGTGCAACATGCTGACCA AATGTACGCCTTGGCGCCGTCGAA
POR A (Met ₂₁₇ , Ile ₂₁₉)	CATTGTGTGCAACATGCTGACCA CTCATCTTGTACGCCTTGGCGC
POR A (Ile ₂₁₆ , Met ₂₁₇ , Ala ₂₁₈)	GCGAAGGTGTGCAACATGCTGACCATGCA CATAATGTACGCCTTGGCGCCGTC
POR B (Phe ₂₁₂)	GTAAGGTTTGTAAACATGCTGACTATGCAGGA TATCTTTAAAGGCTTTGGCGCCATCAAA
POR B (Ile ₂₁₃)	GTAAGGTTTGTAAACATGCTGACTATGCAGGA TATCAATATAGGCTTTGGCGCCATCAAA
POR B (Met ₂₁₄)	AGTAAGGTTTGTAAACATGCTGACTATGC CATTTTATAGGCTTTGGCGCCATCAAA
POR B (Ala ₂₁₅)	CGAAGGTTTGTAAACATGCTGACTATGC CATCTTTATAGGCTTTGGCGCCATC
POR B (Ile ₂₁₆)	TTGTTTGTAAACATGCTGACTATGCAGGA TACTATCTTTATAGGCTTTGGCGCCATC

2.2.3 Überexpression der POR-Enzyme

Zur Herstellung einer Übernachtskultur wurde eine Suspension aus 30 ml 2,5 %-iger LB-Mediumlösung, 100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin und 200 µl Glycerinkultur über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Für die Überexpression wurden 500 ml 2,5 %-iges LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin sowie 5 ml der Übernachtskultur bei 37°C geschüttelt bis eine optische Dichte zwischen 0,5 und 0,7 bei 600 nm, die die exponentielle Wachstumsphase anzeigt, erreicht war. Nach der Zugabe von 1 mM IPTG zur Induktion der Überexpression und dem weiteren Zellwachstum für 3,5 h wurde die Suspension bei 4°C und 10.000 rpm 20 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte bei –20°C.

Die POR B Tyrosin- und Serinmutanten wurden bei 18 °C überexprimiert um die Bildung von Einschlusskörpern, den sogenannten *inclusion bodies*, zu verhindern. Alle anderen Schritte blieben davon unberührt.

2.2.4 Isolierung und Aufreinigung der POR-Enzyme

Für die Aufreinigung wurden folgende Puffersysteme eingesetzt:

Bindungspuffer:	50 mM Tris/HCl 0,5 M NaCl 20 mM Imidazol 0,1 % Triton X-100 20 % Glycerin 0,1 % Mercaptoethanol pH 7,6
Elutionspuffer:	50 mM Tris/HCl 0,5 M NaCl 300 mM Imidazol 0,1 % Triton X-100 20 % Glycerin 0,1 % Mercaptoethanol pH 7,6
Messpuffer:	50 mM Tris/HCl 0,3 M NaCl 0,1 % Triton X-100 20 % Glycerin 7 mM DTT pH 7,6

Die tiefgefrorenen *E. coli* Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 ml 4 °C kaltem Bindepuffer resuspendiert und zur Zelllyse mit 0,2 g CelLytic Express (Sigma) bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 20 min und die Aufreinigung der im Überstand befindenden POR mittels Affinitätschromatografie. Verwendung fanden dafür HisTrap FF vorgepackte Säulen (GE Healthcare). Nach dem Äquilibrieren der Nickelsepharose-Säule mit dem fünffachen Volumen an Bindepuffer wurde die Proteinlösung mittels Spritze aufgetragen und das Enzym nach dem Waschen mit dem 15-fachen Volumen an Bindepuffer mit dem Elutionspuffer eluiert. Zur anschließenden Entsalzung wurden vorgepackte Sephadexsäulen PD-10 (GE Healthcare)

eingesetzt. Nach der Äquilibration mit dem dreifachen Volumen an Messpuffer und dem Auftragen von 2,5 ml des aufgereinigten Enzyms, wurde dieses mit 3,5 ml Messpuffer eluiert.

Da Triton X-100 UV-Licht absorbiert und im Bereich von 450-550 nm fluoresziert, wurde bei allen Fluoreszenzmessungen mit einer Anregung im UV-Bereich Triton X-100 im Binde-, Elutions- und Messpuffer durch 0,1 % Genapol X-80 ersetzt. Außerdem enthielt jedes Puffersystem für die Fluoreszenzmessungen kein Glycerin mehr.

2.2.5 Charakterisierung der POR-Enzyme

Die Überprüfung der Reinheit erfolgte mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Zur Bestimmung der Enzymkonzentrationen wurde die Methode nach Bradford herangezogen.

SDS-PAGElektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 12,5 %-igen Polyacrylamidgelen mit 0,1 % SDS.

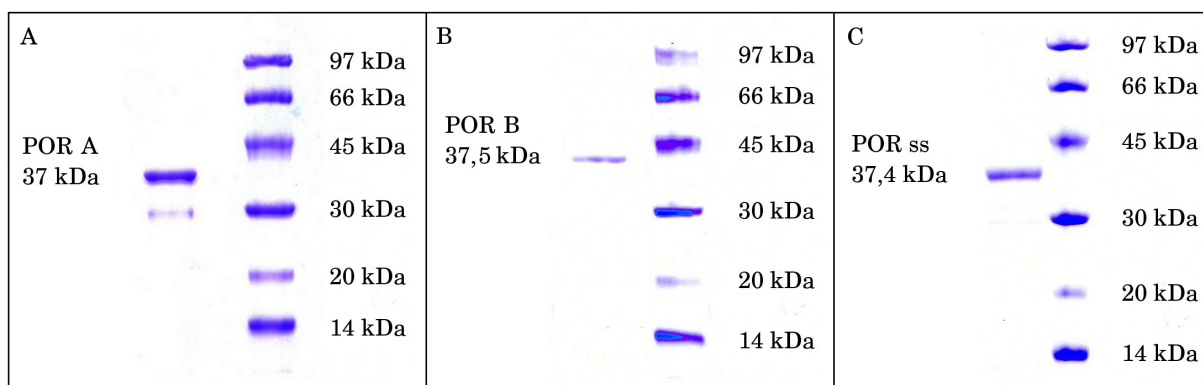


Abbildung 7: Elektropherogramme der Enzyme POR A, POR B und POR ss nach der Aufreinigung an Nickelsepharose. Die Elektrophorese wurde als SDS-Gelelektrophorese in 12,5 %-igem Polyacrylamid-Gel bei 600 V, 25 mA und 15 W ausgeführt.

Zu 10 μ l der Proteinprobe wurden 2 μ l 5 %-ige SDS-Lösung und 2 μ l 0,4 %-ige DTT-Lösung zugefügt und anschließend bei 90 °C für 15 min denaturiert. Als nächstes erfolgte eine erneute Zugabe von 2 μ l DTT und einem Tropfen Bromphenolblau. Die Elektrophorese wurde auf einem Gel der Größe 125 x 110 x 0,5 mm unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

600 V 25 mA 15 W

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel 30 min mit einer wässrigen Fixierlösung aus 50 % Methanol und 10 % Eisessig inkubiert, 2 h mit einer 0,1 % PhastGel Blue R Lösung

(GE Healthcare) gefärbt und über Nacht mit einer wässrigen Lösung aus 25 % Methanol und 10 % Eisessig wieder entfärbt.

Abbildung 7 zeigt die Elektropherogramme, die für die POR A, POR B und POR ss nach der Aufreinigung an Nickelsepharose erhalten wurden. Wie daraus hervorgeht, konnten die POR-Enzyme in hoher Reinheit gewonnen werden. Lediglich die POR A zeigte stets eine schwache zusätzliche Bande, die sich nicht weiter abtrennen ließ.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford Methode

Als Eichsubstanz für die Konzentrationsreihe diente Rinderserumalbumin.

Inkubationsansatz: 50 μ l Proteidlösung

2,5 ml Roti-Quant (Carl Roth), 1:5 mit Wasser verdünnt

Inkubationszeit: 15 min

Anschließend erfolgte das sofortige Vermessen der Proben im Absorptionsspektralphotometer bei 595 nm und die Ermittlung der Proteinkonzentration.

Für die POR A sowie deren Mutanten ergaben sich typische Konzentrationen von ~ 1 mg/ml; für die POR B, die POR ss und den POR B Lysin- und Aspartatmutant von $\sim 0,3$ mg/ml. Der POR B Tyrosin- und Serinmutant konnte nur mit einer Konzentration von maximal 0,08 mg/ml erhalten werden.

Um im Bedarfsfall die Konzentration der Proteidlösungen zu erhöhen, wurden Vivaspin 6 und Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren (Sartorius) verwendet.

2.3 Bestrahlung des PChlide-POR-NADPH-Komplexes

Die Bestrahlung des ternären PChlide-POR-NADPH-Komplexes zur Bestimmung der K_M -Werte für die PChlide-Bindung an die POR und zur Untersuchung der Intensitätsabhängigkeit der Photoreaktion erfolgte mit einem Helium-Neon-Laser 30-05 (Spindler & Hoyer). Die Anregungswellenlänge betrug $\lambda_{exc} = 633$ nm. Für die Bestrahlung des ternären Komplexes zur Ermittlung der Reaktionsquantenausbeuten wurde ein Kryptonionenlaser (Innova 302c, Coherent) verwendet. Hierbei lagen die Anregungswellenlängen bei $\lambda_{exc} = 407, 476$ und 647 nm. In allen Experimenten wurde ein aufgeweiteter Laserstrahl genutzt, um die Bestrahlung der gesamten Probe zu gewährleisten.

Die Leistung am Ort der Probe, aus der sich die Bestrahlungsintensität berechnete, wurde mit einem Powermeter PM100A mit dem Messkopf 5120VC (Thorlabs) bestimmt.

2.4 Spektroskopische Methoden

2.4.1 Stationäre UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie

Die Aufnahme der stationären Absorptionsspektren erfolgte mit einem UV/VIS Spectrometer Lambda 35 (Perkin Elmer Instruments), die der Fluoreszenzspektren mit einem Spex Fluorolog-3 Fluorimeter (Horiba Jobin-Yvon). Die Messung der Tieftemperatur-spektren als auch die Bestimmung der Quantenausbeuten erfolgte mit einem Fluorescence Spectrometer LS 50 (Perkin Elmer). Für die Tieftemperaturmessungen bei 77 K wurde flüssiger Stickstoff eingesetzt. Die Michaeliskonstanten für die NADPH-Bindung wurden mit einem Spektrofluorometer FP-750 (Jasco) bestimmt.

Um innere Filtereffekte bei den Fluoreszenzmessungen gering zu halten, so dass sie das Messergebnis nicht beeinflussen, wurde die Konzentration der Proben so gewählt, dass eine optische Dichte von 0,05 bei der Anregungswellenlänge nicht überschritten wurde.

2.4.2 Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie

Die zeitaufgelösten Absorptionsmessungen wurden, wie in [47] beschrieben, durchgeführt. Zur Erzeugung der Laserpulse diente ein Ti:Saphir Laser (Libra, Coherent Inc.), der ein breites Spektrum von Wellenlängen mit $\lambda_{zentral} = 795$ nm und einer Repetitionsrate von 1 kHz erzeugt. Der Output aus diesem Laser wurde in zwei Teilstrahlen aufgeteilt und jeweils in einen nicht kollinearen optisch parametrischen Verstärker (TOPASwhite, Light-Conversion Ltd.) eingekoppelt. Aus den beiden eingekoppelten Strahlen wurde zum Einen der Anregungspuls bei einer Wellenlänge von $\lambda_{exc} = 630$ bzw. 400 nm und zum Anderen der Abfragepuls bei den Wellenlängen $\lambda_{probe} = 580$ nm und $\lambda_{probe} = 680$ nm erzeugt. Der Anregungspuls hatte eine Pulslänge von 50 fs und durchlief einen Chopper, der jeden zweiten Puls aufhielt. Daraus folgten eine Repetitionsrate von 500 Hz für den Anregungspuls und von 1 kHz für den Abfragepuls. Der Abfragepuls enthält aufgrund dessen, dass jeder zweite Anregungspuls im Gegensatz zum Abfragepuls aufgehalten wird, Informationen über die angeregte und die nicht angeregte Probe. Der Abfragepuls wurde in eine Verzögerungsstrecke eingekoppelt und anschließend mit dem Anregungspuls in die Probe fokussiert, so dass beide überlappten. Durch die Verzögerungsstrecke verlängert sich der Weg des Abfragepulses und damit auch die für diese Strecke benötigte Zeit. Dadurch können die transienten Änderungen der Probe zeitaufgelöst registriert werden.

Die Detektion des Messsignals erfolgte durch eine Photodiode. Die Signale wurden in differentielle Absorptionsänderungen (ΔA) zwischen angeregter und nicht angeregter Probe als Funktion der Verzögerungszeit t und der Wellenlänge des Abfragepulses λ mit einem Detektionssystem (Pascher Instruments AB) umgewandelt. Diese Daten wurden anschlie-

ßend zur Bestimmung der Zeitkonstanten τ_i der beteiligten Prozesse mit einer Summe von Exponentialtermen gefittet. Dabei ist $A_0(\lambda)$ ein konstanter Term, der der Absorptionsänderung bei der Abfragewellenlänge nach langen Zeiten entspricht, und $A_i(\lambda)$ die Amplitude bei der Abfragewellenlänge der kinetischen Komponente i .

$$\Delta A(t, \lambda) = A_0(\lambda) + \sum_{i=1}^N A_i(\lambda) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (1)$$

Des Weiteren wurden zeitaufgelöste Messungen mit Weißlicht als Abfragepuls durchgeführt. Für die Generierung des Weißlicht-Abfragepulses wurde ein Teil des vom Ti:Saphir Laser erzeugten Laserlichts durch ein Saphirfenster geleitet. Das dadurch entstandene Superkontinuum reichte von 475 nm bis 700 nm. Die Detektion erfolgte hierbei durch einen Acton Spectographs SP2150i (Princeton Instruments).

Probenvorbereitung

Für die Messungen am PChlide-POR- bzw. PChlide-POR-NADP⁺-Komplex wurde eine hochkonzentrierte PChlide-Stammlösung in DMSO angefertigt, so dass der prozentuale Anteil an DMSO im Messansatz bei maximal 1 % lag. DMSO diente hierbei als Lösungsvermittler zwischen PChlide und der wässrigen Pufferlösung.

Messansatz des PChlide-POR-Komplexes:	0,04 mM PChlide in DMSO
	0,1 mM POR im Messpuffer

Messansatz des PChlide-POR-NADP ⁺ -Komplexes:	0,04 mM PChlide in DMSO
	0,1 mM POR im Messpuffer
	1 mM NADP ⁺

Als Referenz diente PChlide gelöst in Methanol. Die Konzentration betrug 0,04 mM, was einer OD von 0,3 bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{exc} = 630$ nm in einer 2 mm Küvette entspricht.

2.4.3 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Die Registrierung der Fluoreszenzspektren und -kinetiken erfolgte mit Hilfe der *Streak Camera* Technik analog zu [48].

Zur Anregung der Probe diente ein Ti:Saphir Lasersystem (Mira, Coherent Inc.), das mit einer Repetitionsrate von 76 MHz arbeitete und Laserpulse bei einer Wellenlänge von $\lambda = 830$ nm generierte. Die Erzeugung des Anregungspulses mit $\lambda_{exc} = 610$ nm

erfolgte durch den optisch parametrischen Oszillator OPO (APE Angewandte Physik & Elektronik). Zur Reduzierung der Repetitionsrate von 76 MHz auf 3,6 MHz wurde ein Pulsselektor verwendet. Das zeit- und wellenlängenabhängige Fluoreszenzsignal wurde mit einem CHROMEX 250IS Spectrograph (Chromex Inc.) und einer HPD-TA Streak Camera (Hamamatsu) im Bereich von $\lambda_{em} = 604 - 748$ nm registriert. Die Messdaten zur Bestimmung der Lebensdauern wurden entsprechend Gleichung 1 (Kapitel 2.4.2) gefittet.

Probenvorbereitung

Die Proben für die Messung am PChlide-POR- bzw. am PChlide-POR-NADP⁺-Komplex wurden wie in Abschnitt 2.4.2 angefertigt.

Messansatz des PChlide-POR-Komplexes:	5,8 μ M PChlide in DMSO
	35 μ M POR im Messpuffer

Messansatz des PChlide-POR-NADP ⁺ -Komplexes:	5,8 μ M PChlide in DMSO
	35 μ M POR im Messpuffer
	350 μ M NADP ⁺

Die hier verwendete PChlide-Konzentration entspricht einer OD von 0,2 bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{exc} = 630$ nm und einer Schichtdicke von $d = 1$ cm. Als Referenz fungierte 5,8 μ M PChlide in Methanol.

2.4.4 Zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie

Die Generierung der Laserpulse erfolgte mit einem regenerativen Ti:Saphir Verstärkersystem CPA-2001 (CLARK MXR, Inc.), das Pulse mit einer Wellenlänge von $\lambda = 775$ nm und eine Pulslänge von 170 fs erzeugt. Die Repetitionsrate betrug 635 Hz. Der Output des Lasers wurde in zwei voneinander getrennte Strahlen geteilt, von denen einer in einen nicht-kollinearen optisch parametrischen Verstärker (NOPA) zur Erzeugung des Anregungspulses mit einer Wellenlänge von $\lambda_{exc} = 630$ nm eingekoppelt wurde. Die Pulslänge des Anregungspulses betrug ~ 50 fs, die Pulsenergie am Ort der Probe ~ 500 nJ. Der zweite Teilstrahl wurde zur Generierung des Abfragepulses im MID-IR-Bereich von $1475-1775$ cm⁻¹ durch einen zweistufigen optisch parametrischen Verstärker (OPA) mit anschließender Differenzfrequenzerzeugung verwendet. Jeder zweite Puls des Anregungspulses wurde durch einen Chopper aufgehalten, über eine Verzögerungsstrecke geleitet und anschließend zusammen mit dem Abfragepuls in die Probe fokussiert. Danach durchliefen die Infrarotlichtpulse einen Polychromator, der sie in ihre spektralen

Anteile zerlegte. Die Detektion erfolgte im Anschluss mit einem 32-Kanal Quecksilber-Cadmium-Tellurid-Diodenarray. Die Absorptionsänderungen (ΔA) zwischen der angeregten und der nicht angeregten Probe wurden als Funktion der Verzögerungszeit und der Abfragewellenlänge registriert. Die Daten wurden für Verzögerungszeiten größer als 400 fs zur Bestimmung der Lebensdauern der einzelnen Komponenten mit einer Summe aus Exponentialtermen analog Gleichung 1 (Kapitel 2.4.2) gefittet.

Die Messung erfolgte in einer Rotationsküvette mit einer Schichtdicke von $d = 0,25$ mm, um fortwährend die Anregung der nicht angeregten Moleküle zu gewährleisten.

Probenvorbereitung

PChlide wurde in deuteriertem Methanol gelöst, so dass eine Konzentration von 1,3 mM erreicht wurde. Dies entspricht bei der verwendeten Schichtdicke $d = 0,25$ mm und der Anregungswellenlänge $\lambda_{exc} = 630$ nm einer OD von 1,3.

2.4.5 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden bei 4 °C und 600 bzw. 750 MHz mit dem AVANCE III NMR Spectrometer (Bruker BioSpin), das mit einem Kryoprobenkopf ausgestattet war, aufgenommen. Die Messungen erfolgten unter Argonschutzatmosphäre. Die Bearbeitung der Daten erfolgte mit dem Programm Topspin (Bruker BioSpin). Zur Datenanalyse wurde die Software XEASY herangezogen. Für die Registrierung des ^1H - ^1H -ROESY-NMR-Spektrums wurde eine Mischzeit von 80 ms und eine spektrale Weite von 12 ppm gewählt.

Probenvorbereitung

PChlide wurde in deuteriertem Methanol mit einer Konzentration von 0,3 M gelöst.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Primäre Reaktionsdynamik des Enzymsubstrates PChlide in Lösung und bei Bindung an die POR A

3.1.1 Spektroskopische Charakterisierung und primäre Reaktionsdynamik von PChlide in Lösung

Spektroskopische Charakterisierung von PChlide in Lösung. Das Protochlorophyllid ist ein Porphyrinderivat. Es enthält Magnesium als Zentralatom und einen zusätzlichen Ring, den Cyclopentanonring am Ring C des Porphyringerüsts. Zur Erklärung von Absorptionsspektren typischer Porphyrinsysteme wird das Vier-Orbital-Modell von M. Gouterman herangezogen. [49] [50] Danach finden die elektronischen Übergänge zwischen den zwei höchsten besetzten (HOMO-1 und HOMO) und den zwei niedrigsten unbesetzten Molekülorbitalen (LUMO und LUMO+1) statt. Folglich sind vier elektronische Übergänge möglich. Die Übergänge aus dem HOMO entsprechen den langwelligeren Q-Banden, die aus dem HOMO-1 den energetisch höherliegenden B- oder Soretbanden. Bei diesen elektronischen Übergängen handelt es sich um π - π^* -Übergänge. Je nach Richtung der Übergangsdipolmomente, die in der Molekülebene liegen, ergeben sich die Banden B_x und B_y bzw. Q_x und Q_y .

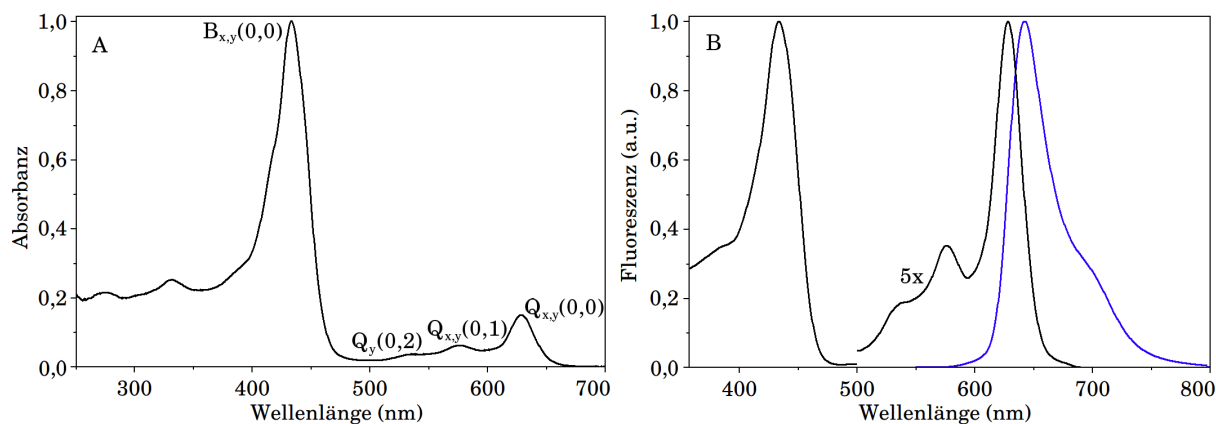


Abbildung 8: Absorptionsspektrum mit Zuordnung der Absorptionsbanden von PChlide in Methanol (A). Fluoreszenzspektrum (blau) bei $\lambda_{exc} = 410$ nm und Fluoreszenzanregungsspektrum bei $\lambda_{em} = 700$ nm (schwarz) des PChlides (B). Der spektrale Bereich von 500 nm bis 700 nm ist zur besseren Veranschaulichung fünffach vergrößert.

Abbildung 8 A zeigt das Absorptionsspektrum von PChlide in Methanol mit der Zuordnung der Absorptionsbanden nach C. Houssier [46] auf Basis des zuvor beschriebenen Vier-Orbital-Modells von M. Gouterman. Die genaue Lage der Absorptionsbanden und

deren Zuordnung zu den elektronischen Übergängen ist in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Spektrale Lage und Zuordnung der Absorptionsbanden von PChlide in Methanol.

Lage der Absorptionsbande [nm]	Bandenzuordnung
433	$B_y(0,0)$
443	$B_x(0,0)$
533	$Q_y(0,2)$
552	$Q_x(0,1)$
576	$Q_y(0,1)$
603	$Q_x(0,0)$
629	$Q_y(0,0)$

Abbildung 8 B zeigt das Fluoreszenzspektrum von PChlide in Methanol bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{exc} = 410$ nm und das Fluoreszenzanregungsspektrum bei einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{em} = 700$ nm. Das Fluoreszenzspektrum besitzt ein Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{max} = 643$ nm und ist zur langwelligen $Q_y(0,0)$ Absorptionsbande bathochrom verschoben. Die Fluoreszenzspektren bei verschiedenen Anregungswellenlängen von $\lambda_{exc} = 410, 420, 430, 450$ und 580 nm sind von diesen unabhängig. Außerdem entspricht das Fluoreszenzanregungsspektrum, das ebenfalls unabhängig von der Emissionswellenlänge ist, dem Absorptionsspektrum. Aus diesem Sachverhalt kann geschlossen werden, dass PChlide in hoher Reinheit und in nur einer Grundzustandsspezies vorliegt. Das ist eine wesentliche Voraussetzung für die spektroskopischen Untersuchungen am PChlide selbst sowie am PChlide-POR-Komplex.

Die hohe Reinheit des PChlides, dessen Güte sich wesentlich von vermessenen Proben anderer Forschungsgruppen [51] abgrenzt, konnte durch Aufreinigung des aus Haferkeimlingen extrahierten Rohproduktes mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie gewonnen werden. Auf diesem Weg konnte das Neben- bzw. Zersetzungsprodukt Protopheophorbid abgetrennt werden. Protopheophorbid ist das metallfreie Analogon des PChlides. Der Verlust des Zentralmetalls tritt in geringfügig saurem Milieu oder auch durch die Lagerung in sauerstoffhaltiger Lösung ein. Abbildung 9 zeigt das Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektrum des Rohproduktes nach der Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln (wässrige Aceton-, ammoniakalische Methanollösung und Ether, siehe Kapitel 2.1.1), des hochreinen PChlides und des abgetrennten Protopheophorbids.

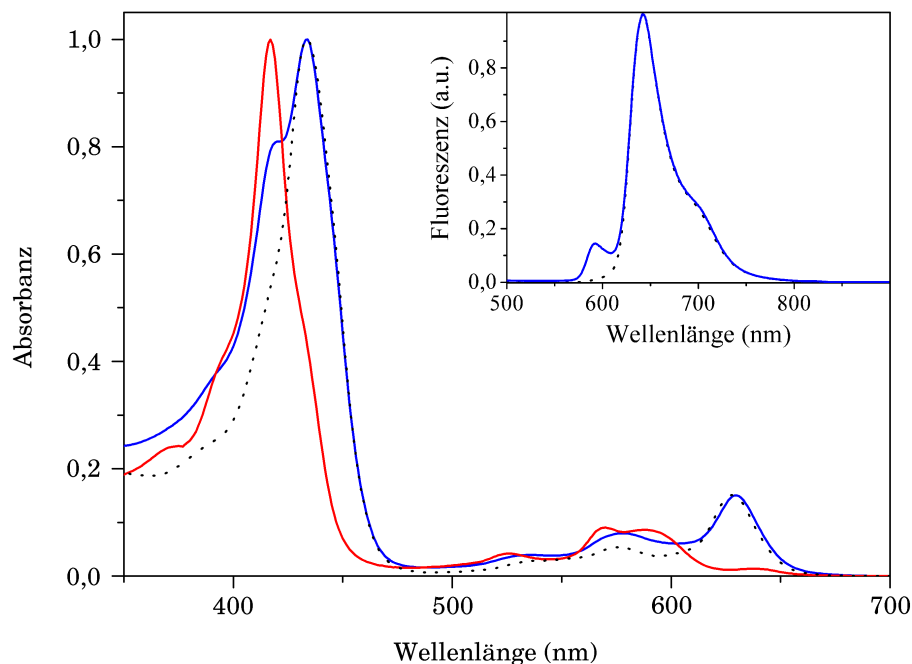


Abbildung 9: Absorptionsspektren der Rohpräparation von PChlide (blau), des HPLC-aufgereinigten PChlides (gepunktet) und der Verunreinigung Protopheophorbid (rot). Inset: Fluoreszenzspektren bei $\lambda_{exc} = 410$ nm der Rohpräparation (blau) und des hochreinen PChlides (gepunktet).

Zur Aufklärung der Raumstruktur des PChlides wurden NMR-spektroskopische Untersuchungen am PChlide vollzogen. Als Solvens diente Methanol. Der Grund dafür ist, dass Methanol ein polares Lösungsmittel ist, das in geeigneter Weise die polare Proteinumgebung imitieren kann.

In Abbildung 10 ist das ^1H -NMR-Spektrum von PChlide in deuteriertem Methanol dargestellt. Die Zuordnung der im Spektrum gezeigten Banden wurde mit Hilfe der ^1H - ^1H -COSY-, ^1H - ^1H -tocsy- und ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren vorgenommen.

Abbildung 11 zeigt das ^1H - ^1H -NMR-ROESY-Spektrum des PChlides. Mit der ROESY Spektroskopie kann die Kopplung von Protonen über den Raum im Abstand von bis zu ~ 5 Å sichtbar gemacht werden. So ist es möglich, anhand der beobachteten Kreuzsignale Beziehungen zwischen Protonen über den Raum aufzudecken und darüber einen Einblick in die Raumstruktur zu gewinnen. Das gemessene Spektrum zeigt, dass es sowohl Kopplungen zwischen H3' und H3'', H8' und H8'' als auch zwischen H17' und H17'' gibt. Weitere Kopplungen zwischen den Protonen sind dem ^1H - ^1H -NMR-ROESY-Spektrum nicht zu entnehmen. Ein Blick auf die Struktur des PChlides (Abbildung 10) zeigt, dass sich die Kopplungen der Protonen nur über eine Bindung erstrecken. Dieser Effekt ist auch darin ersichtlich, dass alle Banden, die im ^1H - ^1H -NMR-ROESY-Spektrum auftreten, ebenso im ^1H - ^1H -COSY-Spektrum zu beobachten sind.

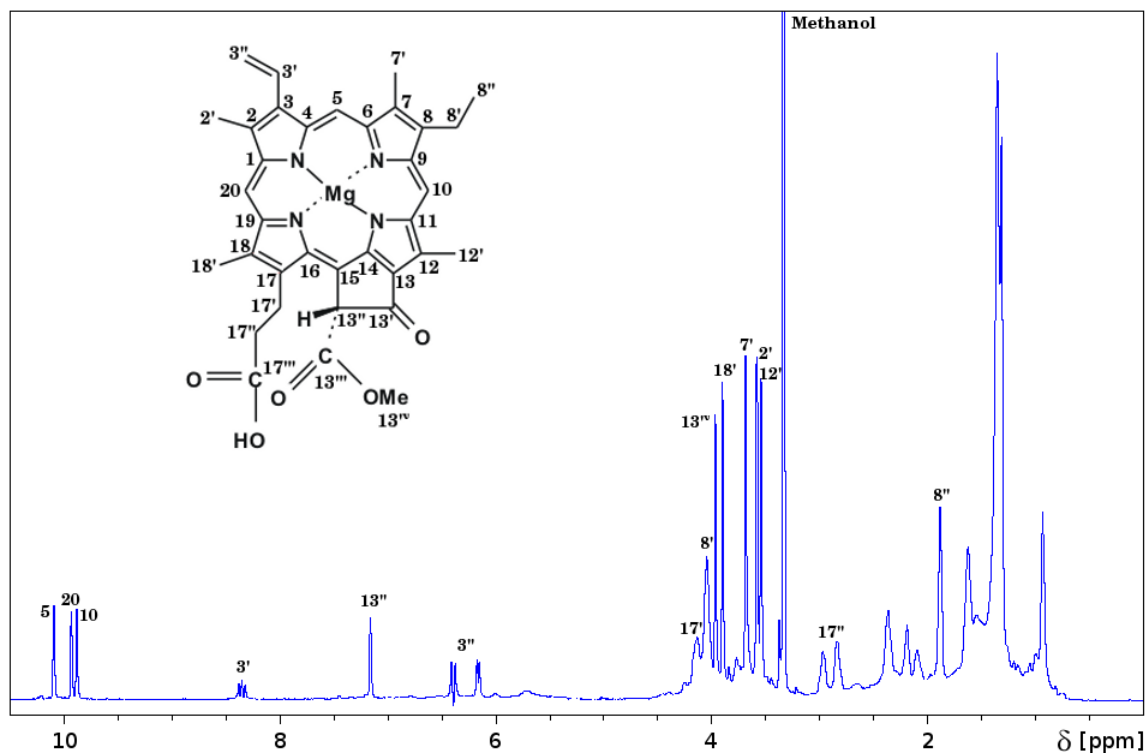


Abbildung 10: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, 4 °C) von PChlide in d_4 -Methanol.

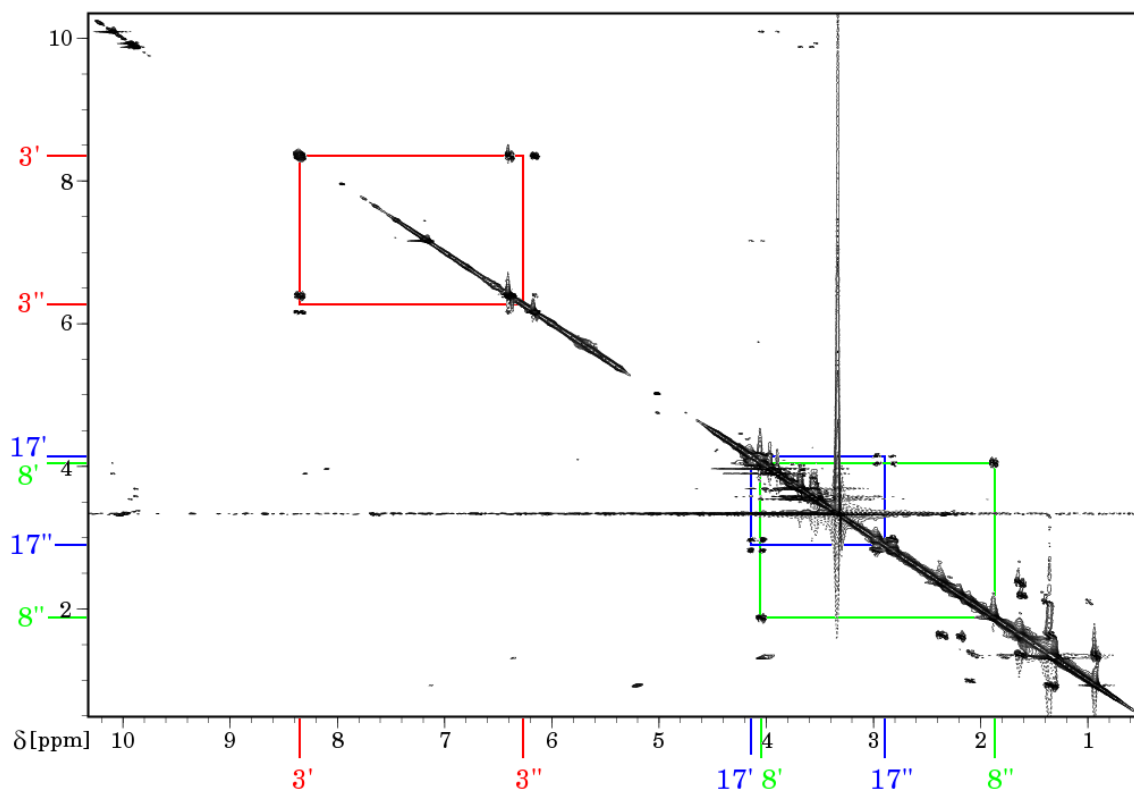


Abbildung 11: ^1H - ^1H -NMR-ROESY-Spektrum von PChlide in d_4 -Methanol im Bereich von $\delta = 0,5$ - $10,3$ ppm. Es treten darin Kreuzsignale für Protonen auf, die weniger als 5 Å voneinander entfernt sind.

Aufgrund des Fehlens von Kopplungen über den Raum, muss der Porphyrinring des PChlides eine planare Struktur einnehmen. Eine solche planare Struktur ist typisch für Porphyrine. [52] Insofern unterscheidet sich das PChlide als Substrat der POR nicht von anderen Porphyrinen.

Primäre Reaktionsdynamik von PChlide in Lösung. Die primären, lichtinduzierten Photoprozesse des freien PChlides in Lösung wurden bisher mittels zeitaufgelöster Absorptions- und Fluoreszenzmessungen charakterisiert. [48] [53] [54] Das daraus gewonnene Modell (Abbildung 12) dient als Grundlage für die fortführenden Untersuchungen in der hier vorgelegten Arbeit. Aufgrund dessen wird es im Folgenden detailliert erläutert.

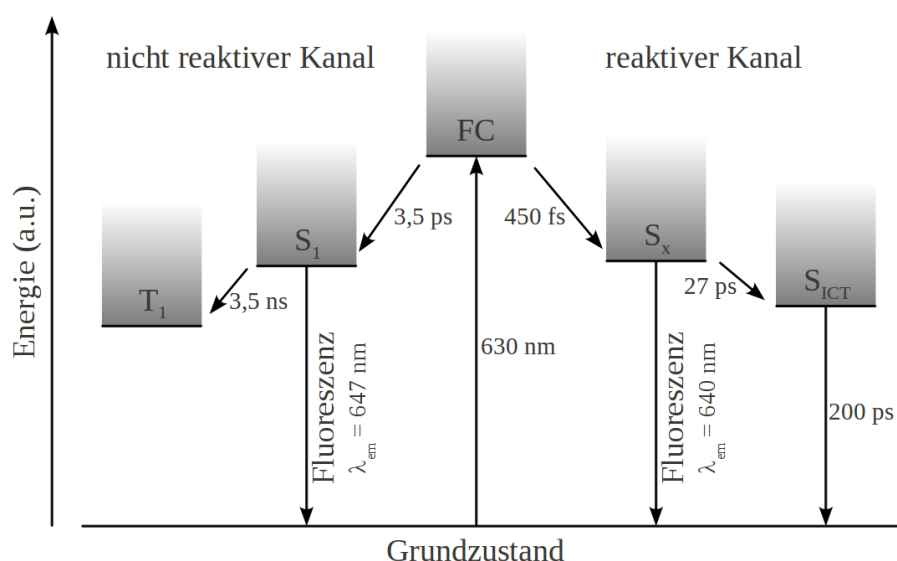


Abbildung 12: Termschema der primären Photoprozesse im PChlide. Das Termschema ist für eine polare Lösungsmittelumgebung gezeigt. [54]

Bei ersten zeitaufgelösten Fluoreszenzuntersuchungen am PChlide in polaren Lösungsmitteln konnten zwei unterschiedliche Kinetiken in zwei verschiedenen spektralen Bereichen der Fluoreszenzbande beobachtet werden. In der Region von $\lambda_{em} = 600-630$ nm zeigten sich zwei Komponenten mit $\tau_2^F = 27$ ps und $\tau_3^F = \geq 3$ ns, während im Bereich von $\lambda_{em} = 660-700$ nm eine Komponente mit jeweils $\tau_1^F = 3,5$ ps- und $\tau_3^F = > 3$ ns gefunden wurde. Sowohl bei dem 27 ps- als auch bei dem > 3 ns-Zustand handelt es sich um angeregte Singulett(S)-Zustände. Die > 3 ns-Komponenten wird mit einer 3,5 ps-Anstiegskinetik gebildet. Aufgrund dieser Tatsachen wurden zwei parallele Reaktionskanäle, über die das in die Franck-Condon-Region angeregte PChlide deaktiviert wird, postuliert. [48]

Erste zeitaufgelöste Absorptionsmessungen zeigten einen zusätzlichen Zustand mit einer Lebensdauer von 200 ps, der nicht fluoreszent ist. Dieser Zustand wird mit ei-

ner Anstiegskinetik von 27 ps gebildet und anschließend mit der 200 ps-Kinetik wieder in den Grundzustand desaktiviert. Dies bedeutet, dass der 200 ps-Zustand unmittelbar aus dem 27 ps-Zustand hervorgeht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Bildung der 200 ps-Komponente einer starken Lösungsmittelabhängigkeit unterliegt. Sie ist nur in polaren Lösungsmitteln (Methanol), nicht aber in unpolaren Lösungsmitteln (Cyclohexan) zu beobachten. Daraus ist auf ein starkes Dipolmoment der 200 ps-Komponente zu schließen, das eine Stabilisierung durch die polare Lösungsumgebung erfährt. PChlide weist in seiner Struktur eine elektronenziehende Gruppe, die C(13')=O Gruppe am Cyclopentanonring (Ring E), die in direkter Konjugation zum π -Elektronensystem des Porphyrinrings steht, auf. Die C(13')=O Gruppe kann Elektronendichte vom Porphyrinringsystem abziehen, so dass es zu einer Ladungsverschiebung innerhalb des PChlide-Moleküls kommt. Aufgrund der Bevölkung des 200 ps-Zustandes in ausschließlich polaren Lösungsmitteln wurde das 200 ps-Intermediat einem intramolekularen Charge-Transfer-Zustand (S_{ICT}) zugeordnet. [53] [55] Ein solcher intramolekularer Charge-Transfer-Zustand ist auch in Carotinoiden, die sich vom Peridinin ableiten und eine an der Polyenseitenkette substituierte C=O Gruppierung enthalten, zu beobachten. [56] [57] Dieser Befund unterstützt die Zuordnung des 200 ps-Zustandes zu einem intramolekularen Charge-Transfer-Komplex (Abbildung 13 A). Eine entscheidende Rolle der C(13')=O Gruppe am Cyclopentanonring bei der Bildung des S_{ICT} -Zustandes lässt sich außerdem anhand von parallelen Untersuchungen am Magnesiumoctaethylporphyrin (MgOEP) nachweisen. MgOEP enthält in seiner Struktur keinen Cyclopentanonring mit elektronenziehender Gruppe (Abbildung 13 B). Nach elektronischer Anregung in die Q-Absorptionsbande zeigt es eine sich stark vom PChlide unterscheidende Reaktionsdynamik. Insbesondere ist kein intramolekularer Charge-Transfer-Zustand im Verlauf der photophysikalischen Desaktivierungsprozesse zu beobachten. [58] Infolge der Ladungsverschiebung innerhalb des PChlide-Moleküls, die mit dem Abziehen von Elektronendichte aus dem Porphyrinringsystem verbunden ist, kann der mit der Reduktion des PChlides im Enzym POR verbundene Protonen- bzw. Hydridtransfer erleichtert werden. Deshalb wird die Desaktivierung des elektronisch angeregten Franck-Condon-Zustandes über den 27 ps- (S_x) und den 200 ps-Zustand (S_{ICT}) als reaktiver Kanal bezeichnet.

Der zweite dazu parallel verlaufende nicht reaktive Desaktivierungskanal führt über einen 3,5 ps-Prozess zur Bevölkung des S_1 -Zustandes. Der 3,5 ps-Prozess spiegelt Schwingungsrelaxation und das sogenannte *cooling*, über die der thermisch äquilibrierte S_1 -Zustand mit einer Lebensdauer von 3,5 ns besetzt wird, wider. Von diesem S_1 -angeregten Zustand aus erfolgt ein *intersystem crossing* in einen langlebigen Triplettzustand des PChlides. Der Triplettzustand weist charakteristische Absorption bei ~ 530 nm und bei

~ 890 nm auf. Dieser Spektralbereich ist typisch für Triplett-Triplett-Absorptionen, wie sie auch in anderen Porphyrinen zu beobachten sind. [59] [60] [61] Von den in den Franck-Condon-Zustand angeregten PChlide-Molekülen werden ausgehend von den zeitaufgelösten Fluoreszenz- und Absorptionsuntersuchungen 60 % über den reaktiven Kanal und 40 % über den nicht reaktiven Kanal desaktiviert. Davon unterliegen, bezogen auf die Anzahl ursprünglich angeregter PChlide-Moleküle 34 % dem *intersystem crossing* in den Triplett-zustand.

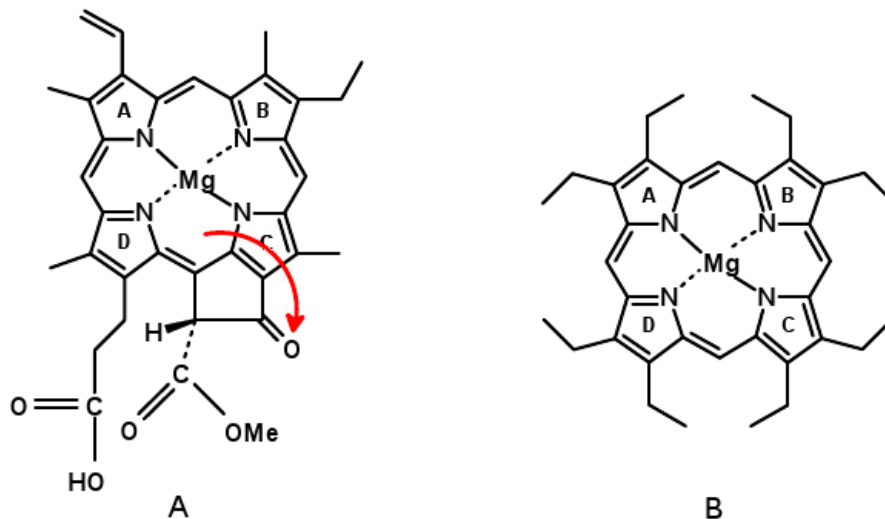


Abbildung 13: A: Postulierter intramolekularer Charge-Transfer-Komplex des PChlides. B: Struktur des Magnesiumoctaethylporphyrins (MgOEP).

3.1.2 Analyse der lichtinduzierten Primärprozesse im PChlide anhand von zeitabhängigen Frequenzverschiebungen in der C(13')=O Carbonylschwingungsmode

Bisherige Untersuchungen mittels zeitaufgelöster IR-Spektroskopie am Substrat PChlide fanden keine Desaktivierung des elektronisch angeregten Zustandes über zwei parallele Reaktionskanäle, sondern einen Reaktionsverlauf entsprechend einem sequentiellen Mechanismus. Die Anregung erfolgte allerdings bei 400 bzw. 475 nm in die Soretbande. [51] Die hier durchgeführten transienten IR-Messungen sollen weiteren Aufschluss über das oben beschriebene Reaktionsmodell geben (siehe Abbildung 12 Kapitel 3.1.1). Ein besonderes Augenmerk ist dabei zum Einen auf die Verzweigung des Reaktionskanals in einen reaktiven und nicht reaktiven Zweig und zum Anderen auf strukturelle Änderungen, die im PChlide direkt nach der Anregung mit der Relaxation des elektronischen Anregungszustandes einhergehen, gerichtet. Im Mittelpunkt des Interesses stehen dabei vor

allem strukturelle Änderungen, die mit der Bildung des intramolekularen Charge-Transfer-Zustandes (S_{ICT}) einhergehen. Wie bereits ausgeführt, trägt der elektronenziehende Effekt der Carbonylgruppe am Cyclopentanonring ($C(13')=O$), die in direkter Konjugation zum π -Elektronensystem des Porphyrinringsystems steht, maßgeblich zur Bildung dieses Zustandes bei. Im Unterschied zu der kürzlich publizierten zeitaufgelösten IR-Arbeit [51] erfolgte die elektronische Anregung in die Q-Bande mit $\lambda_{exc} = 630$ nm. Die Anregung in die Q-Bande führt nicht zur Populierung höherangeregter Zustände, sondern zur direkten Anregung in den S_1 -angeregten Zustand. Somit sind nur die Prozesse beobachtbar, die zur eigentlichen Reaktionsdynamik gehören. Aus diesem Grund wurden insbesondere die dynamischen Prozesse, die Rückschlüsse auf die Carbonylstreckschwingung zulassen, im IR-Bereich verfolgt.

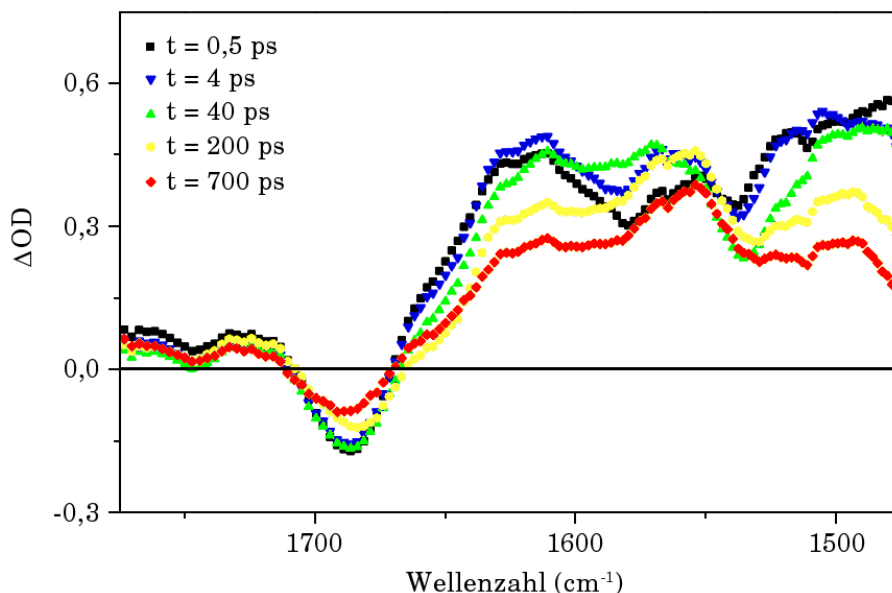


Abbildung 14: IR-Differenzspektren von PChlide in Methanol nach der elektronischen Anregung bei $\lambda_{exc} = 630$ nm. Gezeigt sind die Spektren nach folgenden zeitlichen Verzögerungen ■: 0,5 ps, ▲ : 4 ps, ▲ : 40 ps, ● : 200 ps und ■ : 700 ps.

Abbildung 14 zeigt die transienten IR-Differenzspektren, die nach Anregung des PChlides bei $\lambda_{exc} = 630$ nm und im Wellenzahlbereich von $\lambda = 1775 - 1475$ cm^{-1} zu unterschiedlichen Verzögerungszeiten aufgenommen wurden. Deutlich zu erkennen sind eine negative Bande bei ~ 1686 cm^{-1} und positive Banden unterhalb von 1670 cm^{-1} . Die negative Bande bei 1686 cm^{-1} spiegelt das Ausbleichen der Carbonylschwingungsbande im elektronischen Grundzustand wieder. Die spektrale Lage dieser Bande deckt sich mit der $C=O$ Schwingungsmode bei 1683 cm^{-1} im Bacteriochlorophyll. [62] [63] Weiterhin wird deutlich, dass 700 ps nach der Anregung der Grundzustand zu ~ 50 % wiederbevölkert ist. Da PChlide

eine zusätzliche C=O Gruppe, die Carboxylgruppe der Propionseitenkette (C(17''')OOH), besitzt, könnte diese ebenfalls einen Beitrag zur C=O Streckschwingung leisten. Das sollte allerdings nicht der Fall sein. Der Grund ist, dass die Carboxylgruppe im Gegensatz zur C(13')=O-Gruppe nicht in direkter Konjugation zum π -Elektronensystem des Porphyrinrings steht. Deshalb sollte sie eine Schwingungsfrequenz bei etwas größeren Wellenzahlen aufweisen. Die positiven transienten IR-Banden im Bereich von 1670-1475 cm^{-1} sind auf C=C- und C=N-Schwingungen des Porphyrinrings zurückzuführen.

Zur kinetischen Analyse wurden die gemessenen transienten Absorptionsänderungen ($\Delta A(t, \lambda)$) mit einer Summe von mehreren Exponentialtermen global gefittet:

$$\Delta A(t, \lambda) = A_0(\lambda) + \sum_{i=1}^N A_i(\lambda) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (2)$$

Die beste Anpassung wurde für einen Fit mit einer Summe aus drei Exponentialfunktionen und einem konstanten Rest ($\tau \rightarrow \infty$) erhalten. Die daraus ermittelten Zeitkonstanten sind $\tau_1 = 3,6$ ps, $\tau_2 = 38$ ps und $\tau_3 = 215$ ps. Die Decay-assoziierten Spektren (DAS) für die betreffenden kinetischen Komponenten sind in Abbildung 15 dargestellt. Aus den unterschiedlichen Vorzeichen der Banden in den DAS geht hervor, dass auf der Zeitskala bis 700 ps drei kinetische Prozesse ablaufen, die Änderungen in der Molekülstruktur hervorrufen.

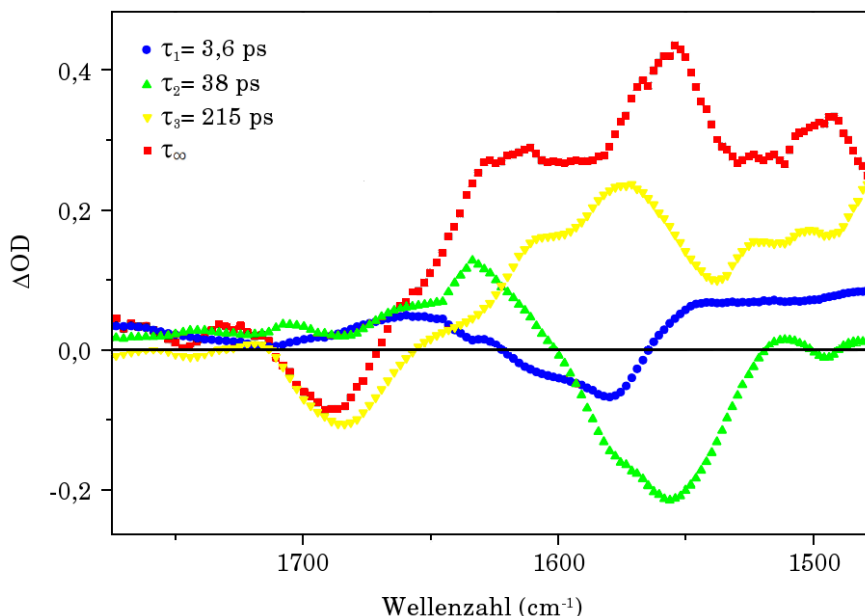
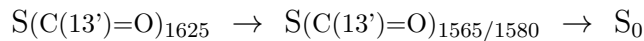


Abbildung 15: Decay-assoziierte Spektren der 3,6 ps- (●), der 38 ps- (▲), der 215 ps- (▲) und der langlebigen Komponente (■) nach der Q-Bandenanregung des PChlides in Methanol.

Das DAS der langlebigen Komponente ($\tau \rightarrow \infty$) ist nahezu identisch mit dem nach 700 ps beobachteten transienten Spektrum (Abbildung 14). Aus dem Vergleich beider Spektren geht hervor, dass nach 700 ps der Grundzustand zu 50 % wiederbevölkert ist. Dieses Ergebnis stimmt recht gut mit einem Wert von 60 % überein, der in den zeitaufgelösten Absorptionsmessungen für die Desaktivierung des elektronisch angeregten PChlides über den reaktiven Kanal bestimmt wurde (siehe Kapitel 3.1.1). [54]

Das DAS der 38 ps-Komponente weist eine positive Bande bei $\sim 1625 \text{ cm}^{-1}$ sowie eine intensive negative Bande bei 1565 cm^{-1} mit einer Schulter bei $\sim 1580 \text{ cm}^{-1}$ auf. Die negative Bande korrespondiert mit einer positiven Bande im 215 ps-DAS. Die positive Bande bei 1625 cm^{-1} kann der Carbonylstreckschwingung im S_1 -angeregten Zustand zugeordnet werden. Eine Bande mit entsprechender spektraler Position wurde im Bacteriochlorophyll bei IR-spektroskopischen Untersuchungen im Femtosekundenbereich bei 1666 cm^{-1} aufgefunden und der angeregten Keto C=O Mode zugeordnet. [63]

Das 215 ps-DAS weist eine negative Bande bei 1685 cm^{-1} auf, die dem Ausbleichen der C(13')=O Grundzustandsabsorption entspricht. Auffallend ist aber vor allem die Korrespondenz zwischen der positiven Bande in diesem Spektrum und der negativen Bande bei $1565/1580 \text{ cm}^{-1}$ im 38 ps-DAS. Dies macht deutlich, dass der 215 ps-Zustand direkt aus dem 38 ps-Zustand gebildet wird. Unter Berücksichtigung der positiven Bande bei 1625 cm^{-1} im 38 ps-DAS ist dieser Übergang mit einer dramatischen Verschiebung der C(13')=O Mode von 1625 cm^{-1} auf $1565/1580 \text{ cm}^{-1}$ verbunden. Die negative Bande bei 1685 cm^{-1} im 215 ps-DAS belegt dann die Desaktivierung dieses Zustandes in den Grundzustand. Aus dem direkten Zusammenhang der Prozesse, die sich im 38 ps- und im 215 ps-DAS widerspiegeln, ergibt sich somit folgender Reaktionsverlauf:



Das 3,6 ps-DAS weist sowohl positive als auch negative Banden zwischen 1660 cm^{-1} und 1580 cm^{-1} mit relativ geringen Amplituden auf. Unterhalb von 1560 cm^{-1} erstreckt sich eine breite, weitgehend unstrukturierte Bande. Auf Grund der folgenden Befunde lässt sich der zugrunde liegende 3,6 ps-Prozess nur so einordnen, dass er über einen parallelen Reaktionsweg die Bildung eines langlebigen, angeregten Zustandes veranlasst.

Zum Einen haben die Amplituden von $\tau_1 = 3,6 \text{ ps}$ dieselbe Größenordnung wie die von $\tau_2 = 38 \text{ ps}$ und von $\tau_3 = 215 \text{ ps}$. Zum Anderen gilt für die Rangordnung der Lebensdauern $\tau_1 \ll \tau_2 \ll \tau_3$. Aufgrund dieser beiden Fakten kann kein zusätzlicher Zustand mit einer Lebensdauer von $\tau_1 = 3,6 \text{ ps}$ nach dem $S(C(13')=O)_{1565/1580}$ -Zustand oder zwischen den beiden Zuständen $S(C(13')=O)_{1625}$ und $S(C(13')=O)_{1565/1580}$ auftreten. Des Weiteren ist nach 215 ps der Grundzustand nur zu etwa 50 % wiederbevölkert. Außerdem ist die Amplitude für $\tau \rightarrow \infty$ nicht gleich Null. Deshalb muss ein zusätzlicher Reaktionsweg, der zu einem

Zustand mit einer Lebensdauer von mehr als 700 ps führt, existieren. Das DAS dieser langlebigen Komponente ($\tau \rightarrow \infty$) beinhaltet neben der C(13')=O Mode bei 1686 cm^{-1} unterhalb von 1670 cm^{-1} stark überlappende Schwingungsmoden meistens mit C=C und C=N in plane Schwingungscharakter.

Bei diesen zeitaufgelösten IR-Messungen konnte gezeigt werden, dass zwei parallele Desaktivierungskanäle des angeregten Zustandes existieren. Der eine Reaktionsweg verläuft sequentiell über einen 38 ps- gefolgt von einem 215 ps-Zustand, der im Anschluss in den Grundzustand zurückgeht. Der zweite parallele Reaktionskanal führt über einen 3,6 ps-Prozess zu einem langlebigen Zustand. Dies deckt sich gut mit dem Modell für die Photoprozesse im PChlide (siehe Kapitel 3.1.1). Zudem sind die durch diese IR-spektroskopischen zeitaufgelösten Untersuchungen bestimmten Lebensdauern in guter Übereinstimmung mit denen, die aus vorausgehenden zeitaufgelösten Absorptions- und Fluoreszenzmessungen erhalten wurden. Die Lebensdauern von $\tau_1 = 3,6\text{ ps}$, $\tau_2 = 38\text{ ps}$ und $\tau_3 = 215\text{ ps}$ entsprechen demnach denen von $\tau_1 = 3,5\text{ ps}$, $\tau_2 = 27\text{ ps}$ und $\tau_3 = 200\text{ ps}$ aus dem in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Modell. Aufgrund der Übereinstimmung der zeitaufgelösten IR-Ergebnisse mit dem Modell kann der S₁₆₂₅-Zustand dem S_x- und der S₁₅₆₅- dem Charge-Transfer-Intermediat (S_{ICT}) zugeordnet werden. Der 3,6 ps-Prozess entspricht der Schwingungsrelaxation bzw. dem *cooling* in den S₁-Zustand. Laut dem Modell geht der S₁-Zustand anschließend in den Triplettzustand über. Der Triplettzustand ist aber aufgrund seiner Langlebigkeit und der kürzeren Zeitskala in den IR-Messungen nicht beobachtbar. Durch die zeitaufgelösten IR-Untersuchungen konnte das Modell der Photoprozesse im PChlide insbesondere die Desaktivierung des Franck-Condon-Zustandes über zwei parallele Reaktionswege voll bestätigt werden.

Die dramatische Rotverschiebung in der C(13')=O Schwingungsmode von 1625 cm^{-1} auf $1565/1580\text{ cm}^{-1}$ beim Übergang von S_x \rightarrow S_{ICT} weist auf eine massive Änderung in der elektronischen Struktur hin. Eine solche Frequenzverschiebung legt nahe, dass die Bindungsordnung der C(13')=O Doppelbindung im angeregten Zustand deutlich herabgesetzt wird und sich der einer Einfachbindung annähert. Die Streckschwingungen von C=O Doppelbindungen in Ketonen sind nämlich im IR-Spektrum typischerweise im Bereich von 1750 cm^{-1} bis 1650 cm^{-1} zu finden, während die der C-O-Einfachbindungen bei $\sim 1150\text{--}1040\text{ cm}^{-1}$ liegen [64]. Die Änderungen in der C(13')=O Schwingungsmode gehen einher mit molekularen Änderungen, die bei der Bildung des S_{ICT}-Zustandes auftreten. Im intramolekularen Charge-Transfer-Komplex erhöht sich die Elektronendichte an der C(13')=O Gruppe. Dies hat einen direkten Einfluss auf die Bindungsordnung der C(13')=O Bindung, deren Doppelbindungscharakter dadurch reduziert wird. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu der

C(13')=O Gruppe durch das protische Lösungsmittel Methanol. Durch diese Wechselwirkung käme es ebenfalls zu einer Erhöhung der Bindungslänge und damit zu einer Stabilisierung des S_{ICT} -Zustandes.

In den zeitaufgelösten IR-Untersuchungen am PChlide konnte gezeigt werden, dass die elektronenziehende Gruppe (C(13')=O) am Cyclopentanonring eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung des S_{ICT} -Zustandes spielt. Die Bildung des intramolekularen Charge-Transfer-Komplexes könnte auch ein wichtiger Prozess in der POR-katalysierten Reduktion des PChlides sein, indem die Elektronendichte aus dem Porphyrinringsystem abgezogen und auf diese Weise der Hydrid- bzw. Protonentransfer erleichtert wird.

3.1.3 Primäre Photoprozesse des PChlides bei Bindung an die POR A

Um den Einfluss der mit dem Substrat interagierenden Proteinumgebung der POR auf die ultraschnelle Reaktionsdynamik des PChlides zu untersuchen, wurden zeitaufgelöste Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen am PChlide-POR-Komplex durchgeführt. Dabei wurden sowohl der Enzym-Substratkomplex (PChlide-POR) als auch der Enzym-Substrat-Komplex in Anwesenheit des oxidierten Cofaktors $NADP^+$ (PChlide-POR- $NADP^+$) vermessen. Der PChlide-POR- $NADP^+$ -Komplex wird im Folgenden als pseudoternärer Komplex bezeichnet. In den beiden PChlide-POR-Komplexen sollten die Photoprozesse beobachtbar sein, die direkt nach der elektronischen Anregung des PChlides und noch vor dessen eigentlichen Reduktion ablaufen. Diese Photoprozesse reflektieren im Besonderen die Prozesse, die mit der Bildung des Übergangszustandes einhergehen. Enzyme setzen die Aktivierungsenergie einer Reaktion herab indem sie den Übergangszustand stabilisieren. Damit ist der Übergangszustand von großer Bedeutung für den Verlauf einer enzymkatalysierten Reaktion. Somit liefern die mit dem Übergangszustand einhergehenden molekularen Prozesse wichtige Aussagen zum Reaktionsmechanismus der enzymkatalysierten Reaktion.

Das PChlide bindet nur korrekt in die Substratbindungstasche der POR ein, wenn zuvor NADPH gebunden ist. [65] Als Alternative zum NADPH kann auch $NADP^+$ verwendet werden, weil beide Cofaktoren offenbar über den Adenosindiphosphat-Rest mit dem NADPH-Bindungsmotiv (GxxxGxG) wechselwirken. [43] In Anwesenheit des oxidierten Cofaktors $NADP^+$ findet keine Reduktion des PChlides statt. Angesichts dieses Sachverhaltes wurde neben dem PChlide-POR-Komplex auch der PChlide-POR- $NADP^+$ -Komplex untersucht. An der POR aus *Thermosynechococcus elongatus*, ein thermophiles Cyanobakterium, wurden ähnliche Dissoziationskonstanten für das PChlide von $2,8 \mu\text{M}$ in Gegenwart von $NADP^+$ und von $5,6 \mu\text{M}$ in Anwesenheit von NADPH bestimmt. [13] [43] In den im Kapitel 3.2.3 beschriebenen Bindungsstudien konnte eine Bindungskonstante

von 3 μM für die Bindung des PChlides an die POR A in Gegenwart von NADPH ermittelt werden. In Bezug auf die vergleichbaren Bindungskonstanten für PChlide in Anwesenheit des reduzierten und oxidierten Cofaktors ergibt sich aus dieser Bindungskonstante ein prozentualer Anteil an gebundenen PChlide von 91 % bzw. 95 % in den zeitaufgelösten Fluoreszenz- bzw. Absorptionsmessungen.

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden an der POR A aus Gerste (*Hordeum vulgare* L.) durchgeführt. Das sind die ersten Analysen zur ultraschnellen Reaktionsdynamik an einer POR aus höheren Pflanzen. Ein weiterer Unterschied zu den bisher publizierten Arbeiten an der POR aus Cyanobakterien [37] [38] besteht in der elektronischen Anregung des PChlides im Enzym-Substrat-Komplex in die $Q_y(0,0)$ -Bande. Die ermöglicht die Beobachtung der Prozesse, die mit der eigentlichen Photoreaktion in Zusammenhang stehen. In den nachfolgenden zeitaufgelösten Untersuchungen wurden die PChlide-POR-Komplexe mit dem ungebundenen PChlide verglichen. Als ungebundenes PChlide diente dieses gelöst in Methanol. Das lag darin begründet, dass der Messpuffer, in dem die POR-Komplexe vorlagen, 0,1 % Triton X-100 enthielt, und durch dessen Micellenbildung eine unpolare Umgebung um die PChlide-Moleküle erzeugt wurde. Aufgrund dessen zeigt PChlide im Tritonmesspuffer die Reaktionskinetik, wie sie in unpolaren Lösungsmitteln zu beobachten ist. Insbesondere bildet sich unter diesen Bedingungen kein intramolekularer Charge-Transfer-Zustand aus, der jedoch für die Photochemie im POR-Enzym eine große Rolle spielen könnte. Des Weiteren sollte Methanol als polares Lösungsmittel die Bindungstasche des PChlides in der POR mehr imitieren können als die unpolaren Tritonmicellen. [51]

Spektroskopische Charakterisierung des PChlide-POR- und PChlide-POR-NADP⁺-Komplexes. In Abbildung 16 sind das Absorptions-, Fluoreszenz- und Fluoreszenzanregungsspektrum des pseudoternären Komplexes und des ungebundenen PChlides in Methanol bei 298 K dargestellt. Die Banden im Absorptionsspektrum des PChlide-POR-NADP⁺-Komplexes stimmen mit dem des ungebundenen PChlides (siehe Kapitel 3.1.1) überein. Es kommt lediglich zu einer leichten Verschiebung der Absorptionsmaxima. Das Maximum der Soretbande ($B_y(0,0)$) des pseudoternären Komplexes ist im Vergleich zum ungebundenen PChlide um 5 nm auf $\lambda = 438$ nm verschoben. Die $Q_y(0,0)$ -Bande verlagert sich im POR-Komplex um 1 nm auf $\lambda = 630$ nm, die $Q_y(0,1)$ - ebenfalls um 1 nm auf $\lambda = 577$ nm und die $Q_y(0,2)$ -Bande um 2 nm auf $\lambda = 535$ nm. Das Fluoreszenzspektrum des ungebundenen PChlides ist sichtbar breiter und die Schulter bei ~ 685 nm ausgeprägter. Das Fluoreszenzmaximum ist im pseudoternären Komplex um 6 nm auf $\lambda = 637$ nm verschoben. Die leichte Verschiebung der Maxima ist allerdings auf den Effekt

des Lösungsmittels Methanol und nicht auf das Einbinden in die POR zurückzuführen. Dies zeigt sich daran, dass alle Banden, die im Absorptions-, Fluoreszenz- und Fluoreszenzanregungsspektrum des PChlide-POR- bzw. PChlide-POR-NADP⁺-Komplexes auftreten, exakt auf den Banden der jeweiligen Spektren des ungebundenen PChlides im Tritonmesspuffer liegen.

Außerdem ist das Fluoreszenz- bzw. Fluoreszenzanregungsspektrum unabhängig von der Anregungs- bzw. Fluoreszenzwellenlänge. Das bedeutet, dass auch im pseudoternären Komplex nur eine Grundzustandsspezies des PChlides vorliegt.

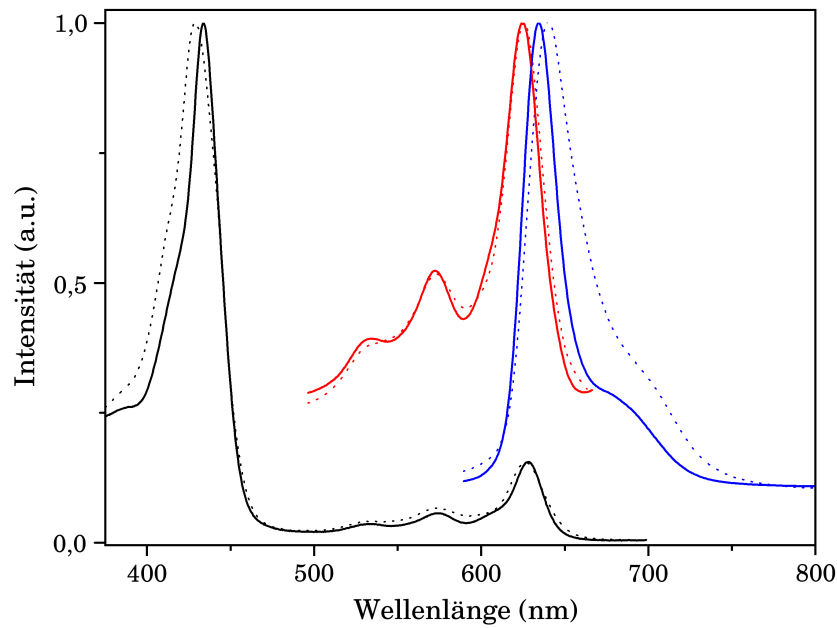


Abbildung 16: Stationäres Absorptions- (schwarz), Fluoreszenz- (blau) und Fluoreszenzanregungsspektrum des pseudoternären PChlide-POR-NADP⁺-Komplexes (—) und des ungebundenen PChlides in Methanol (- - -) bei 298 K. Das Fluoreszenzspektrum ist für eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{exc} = 578$ nm und das Fluoreszenzanregungsspektrum für eine Emissionswellenlänge von $\lambda_{em} = 690$ nm im roten Spektralbereich gezeigt. Alle Spektren sind auf 1 normiert. Die spektrale Lage und Form der Fluoreszenzspektren ändert sich bei Anregung in die Soretbande mit $\lambda_{exc} = 430$ nm nicht.

Eine Änderung der spektroskopischen Eigenschaften des PChlides, die bei dessen Bindung an die POR zustande kommt, ist in Tieftemperaturmessungen bei 77 K zu beobachten (Kapitel 3.2.3). Diese Änderung zeigt sich in einer Rotverschiebung der Fluoreszenzbande von $\lambda = 628$ nm im ungebundenen PChlide auf $\lambda = 641$ nm im pseudoternären Komplex. Außerdem weist das Fluoreszenzanregungsspektrum bei $\lambda_{em} = 631$ nm im Vergleich zu dem bei $\lambda_{em} = 644$ nm bathochrome Verschiebungen auf (siehe Abbildung 25 Kapitel 3.2.3). Dieser bei 77 K beobachtbare Effekt geht offensichtlich bei 298 K in der vibronischen Verbreiterung der Absorptions- bzw. Fluoreszenzbanden unter.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen. Abbildung 17 zeigt die transienten Fluoreszenzspektren des ungebundenen PChlides, des PChlide-POR- und des PChlide-POR-NADP⁺-Komplexes in den beiden Zeitfenstern 40-200 ps und 640-870 ps nach der elektronischen Anregung bei $\lambda_{exc} = 610$ nm.

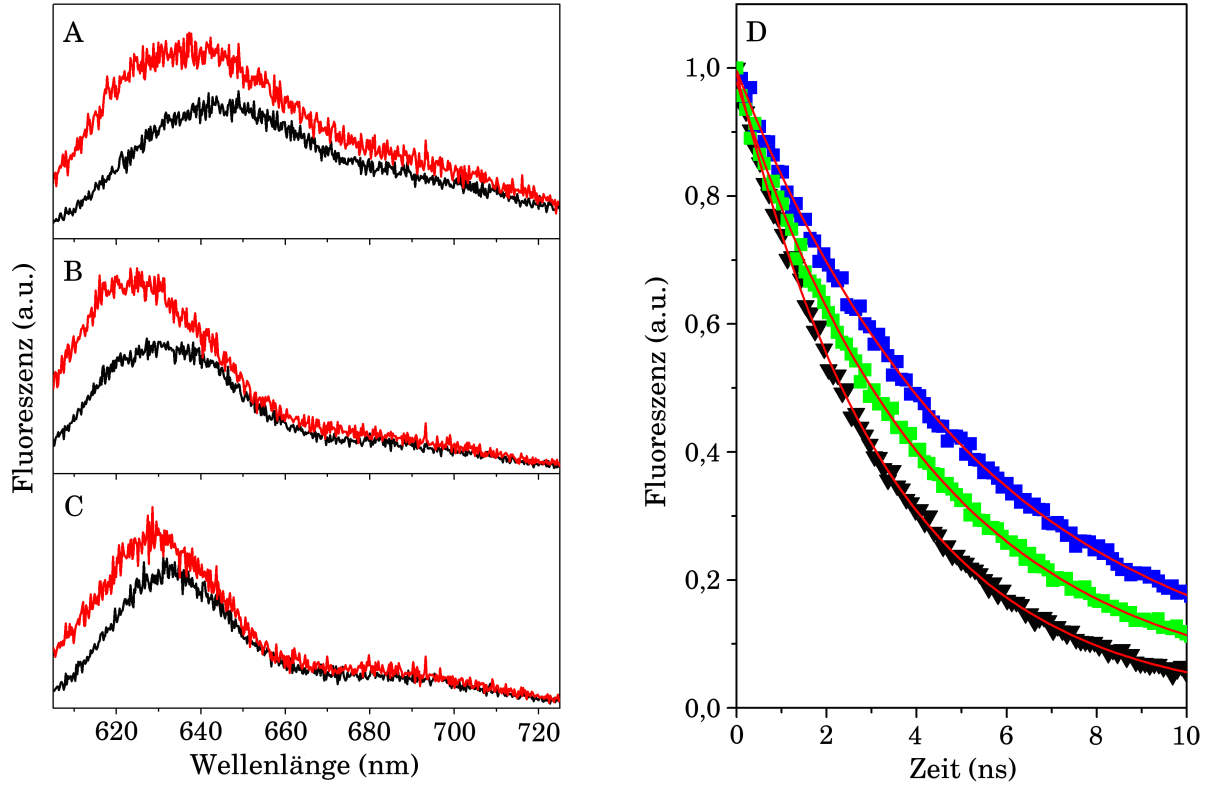


Abbildung 17: Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von PChlide in Methanol (A), vom PChlide-POR- (B) und vom PChlide-POR-NADP⁺-Komplex (C) in den Zeitfenstern 40-200 ps (rot) und 640-870 ps (schwarz) und Fluoreszenzkinetiken (D) von PChlide in Methanol (▲), vom PChlide-POR- (■) und vom pseudoternären Komplex (■) nach der elektronischen Anregung bei $\lambda_{exc} = 610$ nm. Die Fluoreszenzkinetiken wurden über den Wellenlängenbereich $\lambda = 605\text{--}725$ nm integriert und monoexponentiell mit $I_F(t) = A \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$ gefittet (rot). Die untersuchten PChlide-POR-(NADP⁺)-Komplexe enthielten 35 μM POR, 5,8 μM PChlide (und 350 μM NADP⁺).

In den Fluoreszenzspektren wird ersichtlich, dass zwar die Fluoreszenzintensität sowohl der Hauptbande als auch der Schulter abklingt, aber dass die Intensitätsabnahme in den beiden Banden nicht miteinander korreliert. Dieses unterschiedliche kinetische Verhalten, das schon in vorherigen zeitaufgelösten Fluoreszenzuntersuchungen am ungebundenen PChlide [48] beobachtet werden konnte, geht auf die Existenz zweier Fluoreszenzkomponenten zurück. Die eine von beiden besitzt ein Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{max} = 640$ nm, klingt mit $\tau_F = \sim 30$ ps ab und konnte der Fluoreszenz aus dem angeregten S_x -Zustand zugeordnet werden (Abbildung 12 Kapitel 3.1.1). Die zweite Fluoreszenzkomponente mit

einem rotverschobenen Emissionsmaximum von $\lambda_{max} = 647$ nm klingt mit einer ns-Kinetik ab und ist der Fluoreszenz aus dem angeregten S_1 -Zustand zugeordnet. Abbildung 17 zeigt außerdem die ns-Fluoreszenzkinetiken der beiden POR-Komplexe und des ungebundenen PChlides. Daraus ist ersichtlich, dass die Fluoreszenzintensität der beiden POR-Komplexe langsamer abklingt als die des ungebundenen PChlides.

Eine gute Anpassung der Messwerte ergab sich durch den Fit mit einer monoexponentiellen Fitfunktion, der Fluoreszenzabklingzeiten von $\tau_F = 3,4$ ns für das ungebundene PChlide und $\tau_F = 4,4$ ns bzw. $5,4$ ns für den PChlide-POR- bzw. den pseudoternären Komplex lieferte (Tabelle 3). Die Verlängerung in den Abklingzeiten stellt eine Verlängerung der Lebensdauer des S_1 -Zustandes in den beiden POR-Komplexen dar. Um die Ursachen für diese längeren Lebensdauern zu finden, wurden die radiativen und nicht radiativen Konstanten für die Desaktivierung aus dem S_1 -Zustand berechnet. Für die Berechnung dieser Konstanten erfolgte die Annahme, dass die Fluoreszenz aus dem S_x -Zustand vernachlässigt werden kann, weil die Fluoreszenzlebensdauer des S_x -Zustandes mit $\tau_F = \sim 30$ ps sehr kurz und damit auch die Fluoreszenzquantenausbeute gering ist. Die radiativen (k_F) und nicht radiativen (k_{nr}) Konstanten wurden wie folgt berechnet:

$$k_F = \frac{\Phi_F}{\tau_F} \qquad k_{nr} = \frac{k_F}{\Phi_F} - k_F \qquad (3)$$

Tabelle 3: Übersicht über die Fluoreszenzlebensdauern τ_F und -quantenausbeuten Φ_F , sowie über die radiativen k_F und nicht radiativen Konstanten k_{nr} des ungebundenen PChlides, des PChlide-POR- sowie des pseudoternären Komplexes (PChlide-POR-NADP⁺). Für die Fluoreszenzquantenausbeuten, die radiativen sowie die nicht radiativen Konstanten sind die jeweiligen Fehlergrenzen angegeben.

	PChlide in Methanol	PChlide-POR	PChlide-POR-NADP ⁺
τ_F [ns]	3,4	4,4	5,4
Φ_F	$0,06 \pm 0,002$	$0,09 \pm 0,015$	$0,09 \pm 0,016$
k_F [s ⁻¹]	$1,8 \cdot 10^7 \pm 5,9 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^7 \pm 3,4 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^7 \pm 3,0 \cdot 10^6$
k_{nr} [s ⁻¹]	$2,8 \cdot 10^8 \pm 6,0 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^8 \pm 3,4 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^8 \pm 3,0 \cdot 10^6$

In Tabelle 3 sind die experimentell bestimmten Fluoreszenzquantenausbeuten (Φ_F), Fluoreszenzlebensdauern (τ_F) sowie die berechneten radiativen (k_F) und nicht radiativen Konstanten (k_{nr}) für die beiden POR-Komplexe und das ungebundenen PChlide dargestellt. Auffallend ist eine deutliche Abnahme der nicht radiativen Konstanten für die POR-Komplexe im Vergleich zum ungebundenen PChlide. Im PChlide-POR-Komplex liegt diese Abnahme bei ~ 30 %, während sie im PChlide-POR-NADP⁺-Komplex schon bei ~ 40 % liegt.

In zeitaufgelösten Absorptionsmessungen ist keine merkliche Wiederbevölkerung des Grundzustandes durch ein *internal conversion* aus dem S_1 -Zustand zu beobachten. Daher dominieren zwei Prozesse, über die der angeregte S_1 -Zustand deaktiviert werden kann. Das ist zum Einen die Fluoreszenz in den Grundzustand als radiativer und zum Anderen das *intersystem crossing* in den Triplettzustand als nicht radiativer Prozess. Die deutlich kleineren nicht radiativen Konstanten in den beiden POR-Komplexen sind somit im Wesentlichen mit einer geringeren Ratenkonstante für das intersystem crossing, die zu einer geringeren Bevölkerung des Triplettzustandes führt, zu erklären. Den größten Effekt zeigt dabei der pseudoternäre Komplex, was darauf hindeutet, dass das gebundene $NADP^+$ eine wichtige Rolle für die korrekte Einbindung des PChlides im aktiven Zentrum der POR spielt.

Die Behinderung des *intersystem crossing* in den Triplettzustand durch das POR-Enzym ist von großer biologischer Bedeutung. Porphyrine zeigen im Allgemeinen hohe Triplettquantenausbeuten. [54] [59] [66] [67] Aus Triplettzuständen entstehen über Energietransferprozesse leicht Singulett-Sauerstoff oder andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Diese reaktiven Formen des Sauerstoffs sind schädlich für Organismen, da sie eine große Rolle beim oxidativen Stress spielen und so zur Zerstörung der organischen Moleküle in der Zelle (Lipide, Proteine, DNA...) führen. Während der Photosynthese geht der Schutz vor den anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies auf die Carotinoide in den Antennenkomplexen zurück. Diese sind in der Lage sowohl Triplettzustände als auch Singulett-Sauerstoff strahlungslos zu löschen. [68] Da bislang keine Involvierung von Carotinoiden in den ternären POR-Komplex bekannt ist, scheint das Enzym selbst diese Schutzfunktion zu übernehmen, indem es direkt in die Reaktionsdynamik des PChlides eingreift und so die Kanalisierung der Anregungsenergie in die Bildung des Triplettzustandes beeinträchtigt. Die Schutzfunktion, die während der Chlorophyllbiosynthese vor oxidativem Stress von der POR selbst übernommen wird, scheint zusätzlich zu der zu existieren, die während der Deetiolierungsphase in den höhermolekularen Lichtsammelkomplexen gefunden wurden (siehe Kapitel 1.1). [12]

Zeitaufgelöste Absorptionsmessungen. Abbildung 18 zeigt die differentiellen Absorptionsänderungen für das ungebundene PChlide und die beiden POR-Komplexe (PChlide-POR und PChlide-POR- $NADP^+$) in einem dreidimensionalen Plot als Funktion der Wellenlänge und der Verzögerungszeit. Sowohl im ungebundenen PChlide (Abbildung 18 A) als auch in den beiden POR-Komplexen (Abbildung 18 B und C) ist das Ausbleichen der Grundzustandsabsorption als negativer Beitrag zur Absorptionänderung bei ~ 630 nm erkennbar.

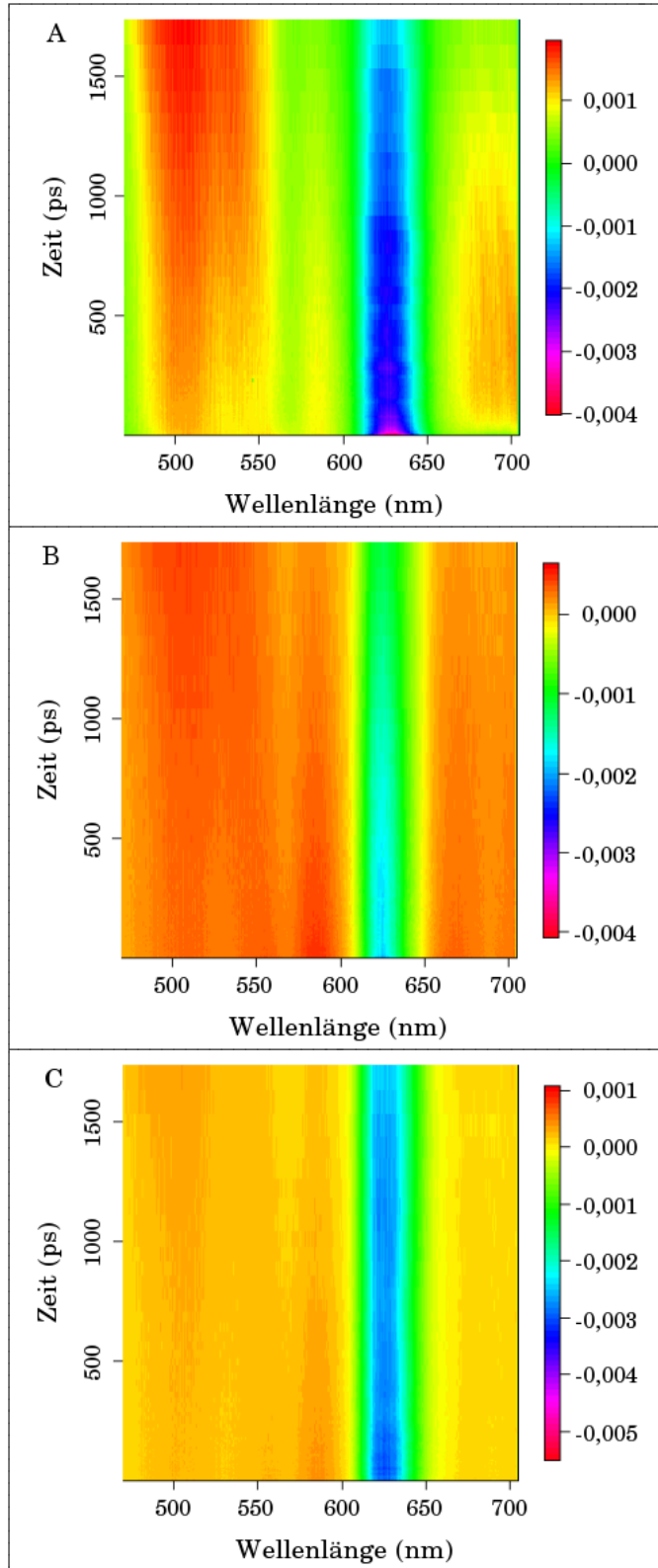


Abbildung 18: Transiente Absorptionsänderungen (ΔOD) im ungebundenen PChlide (A), im PChlide-POR-Komplex (B) sowie im pseudoternären PChlide-POR-NADP⁺-Komplex (C) als Funktion der Verzögerungszeit und der *probe* Wellenlänge, beobachtet nach der elektronischen Anregung bei $\lambda_{exc} = 630$ nm. Die untersuchten POR-Komplexe im Tritonmesspuffer enthielten 0,1 mM POR, 0,04 mM PChlide (und 1 mM NADP⁺).

Positive transiente Absorptionen sind im ungebundenen PChlide sowohl unterhalb 550 nm als auch oberhalb 660 nm zu beobachten. Die transiente Absorption im ns-Zeitbereich bei ~ 500 nm konnte durch vorherige zeitaufgelöste Absorptionsmessungen der Bildung des

Triplettzustandes zugeordnet werden und die transiente Absorption bei ~ 680 nm im Zeitbereich von ≤ 500 ps der Bildung des intramolekularen Charge-Transfer-Zustandes (S_{ICT}) (siehe Abbildung 12 Kapitel 3.1.1). [53] [54] [55] Die Triplettabsorptionsbande bei ~ 500 nm ist auch in den beiden POR-Komplexen sichtbar. Die Intensität dieser transienten Absorption ist allerdings bei den gleichen Konzentrationen an ungebundenen und im POR-Komplex gebundenen PChlide in den POR-Komplexen geringer als im ungebundenen PChlide. Dieser Effekt deckt sich mit dem Ergebnis der im vorherigen Abschnitt beschriebenen zeitaufgelösten Fluoreszenzuntersuchungen. Auf eine geringere Bevölkung des Triplettzustandes in den POR-Komplexen konnte dabei aufgrund der deutlich kleineren nichtstradiativen Konstanten in den POR-Komplexen im Vergleich zum ungebundenen PChlide geschlossen werden (siehe Tabelle 3 dieses Kapitels). Die transiente Absorption im ungebundenen PChlide bei ~ 680 nm, die der Bildung des S_{ICT} -Zustandes entspricht, existiert bei dieser Wellenlänge nicht in den beiden POR-Komplexen. Ein analoger Auf- und Abbau dieser transienten Absorption kann aber in den POR-Komplexen bei ~ 580 nm beobachtet werden.

Um genauere Aussagen über den zeitlichen Verlauf der transienten Absorptionen bei 580 nm und 680 nm treffen zu können, wurden die Kinetiken bei diesen beiden Wellenlängen in einem weiteren Experiment mit einer Photodiode als Detektor gemessen. Dadurch konnte ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erhalten werden.

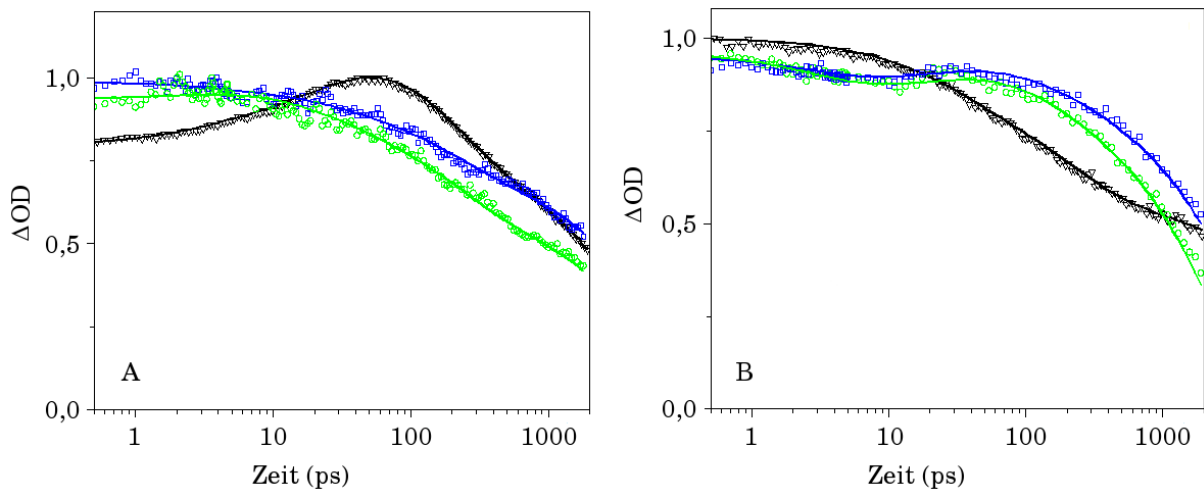


Abbildung 19: Kinetiken der transienten Absorptionsänderungen (ΔOD) bei 680 nm (A) und bei 580 nm (B) für ungebundenes PChlide (\blacktriangle), den PChlide-POR- (\bullet) und den pseudoternären PChlide-POR-NADP⁺-Komplex (\blacksquare). Die Zeitskala ist logarithmisch dargestellt. Die aus den besten Fits berechneten Kinetiken sind als durchgezogene Funktionen wiedergegeben. Die weiteren experimentellen Details sind analog zu denen in Abbildung 18.

Abbildung 19 zeigt die Kinetiken des ungebundenen PChlides und der beiden POR-

Komplexe bei 680 nm (A) und bei 580 nm (B). Alle darin gezeigten Kinetiken ließen sich gut mit einer Summe aus vier Exponentialfunktionen und einem konstanten Term analog Gleichung 2 in Kapitel 3.1.2 fitten. Der konstante Term reflektiert die Bildung des langlebigen Triplettzustandes. Die aus dem Fit resultierten Lebensdauern waren, wie schon für das ungebundene PChlide zuvor bekannt, $\tau_1 = 3$ ps, $\tau_2 = 27$ ps, $\tau_3 = 200$ ps und $\tau_4 = \tau_F$ (Tabelle 3 dieses Kapitels). [54] Die Kinetik für das ungebundene PChlide bei 680 nm zeigt mit einer Anstiegskinetik von 27 ps die erwartete Bildung des S_{ICT} -Zustandes, der mit einer 200 ps-Kinetik in den Grundzustand abklingt. Beide POR-Komplexe zeigen diese Reaktionsdynamik bei 680 nm nicht, sondern ein Abklingen der transienten Absorption. Das Fehlen der für das PChlide typischen 27 ps-Anstiegskinetik in den POR-Komplexen ist eindeutig zu beobachten. Diese Anstiegskinetik tritt allerdings bei der transienten Absorption bei 580 nm auf, wo auch das Abklingen des sich mit 27 ps gebildeten S_{ICT} -Zustandes mit 200 ps sichtbar wird. Die Kinetik des ungebundenen PChlides bei 580 nm zeigt hingegen nur Abklingprozesse. Im längeren Zeitbereich werden die transienten Absorptionsänderungen sowohl bei 580 nm als auch bei 680 nm von der Kinetik des angeregten S_1 -Zustandes bestimmt, der ein Abklingverhalten im ns-Bereich zeigt und in den Triplettzustand und parallel dazu in den Grundzustand deaktiviert wird. Die Verlängerung der Abklingzeit des S_1 -Zustandes in den beiden POR-Komplexen zeichnet sich auch hier merklich ab.

Ein zusätzlicher interessanter Fakt betrifft das Verhältnis der relativen Amplituden $\frac{A_2}{A_3}$ der Komponenten, die für die Bildung mit $\tau_2 = 27$ ps und den Zerfall mit $\tau_3 = 200$ ps des S_{ICT} -Zustandes stehen. Das Amplitudenverhältnis für den PChlide-POR- bzw. den PChlide-POR-NADP⁺-Komplex bei 580 nm beträgt 0,71 ($\frac{-5,0}{7,0}$) bzw. 0,78 ($\frac{-4,5}{6,0}$), das für das ungebundene PChlide 0,78 ($\frac{-19,5}{25,0}$) bei 680 nm. Diese Werte verdeutlichen, dass die transienten Absorptionsänderungen bei 580 nm in den beiden POR-Komplexen die Kinetik des S_{ICT} -Zustandes aufweisen. Das bedeutet, dass die Absorption des S_{ICT} -Zustandes in den POR-Komplexen eine Blauverschiebung widerfährt. Eine solche hypsochrome Verschiebung liegt offenbar in der Stabilisierung des intramolekularen Charge-Transfer-Komplex durch die Proteinumgebung im aktiven Zentrum begründet (Abbildung 20).

In den zeitaufgelösten IR-spektroskopischen Untersuchungen (Kapitel 3.1.2) konnte gezeigt werden, dass die Bildung des S_{ICT} -Zustandes einhergeht mit einer Erhöhung der Bindungslänge der Carbonylgruppe am Cyclopentanonring. Dieser Effekt ließe sich mit der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen vom Lösungsmittel Methanol zur Carbonylgruppe begründen, wodurch es zu einer Stabilisierung des S_{ICT} -Zustandes kommt. Die in diesen zeitaufgelösten Absorptionsmessungen belegte Stabilisierung des S_{ICT} -Zustandes durch die Proteinumgebung könnte ebenfalls auf der Ausbildung von Wasserstoff-

brückenbindungen beruhen. Die PChlide-Bindungstasche, die sich aus den Aminosäuren Tyr-Lys-Asp-Ser-Lys zusammensetzt, zeigt die Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Um weiterführende Aussagen darüber zu treffen, wurde der Einfluss der Aminosäuren im aktiven Zentrum auf die Enzymaktivität untersucht, indem Punktmutationen in der PChlide-Bindungstasche eingeführt wurden (Kapitel 3.2.5). Der S_{ICT} -Zustand wird auch in einer polaren Lösungsumgebung stabilisiert. [53] Da es sich bei allen Aminosäuren in der PChlide-Bindungstasche um polare Aminosäuren handelt, könnte es sich bei der Stabilisierung des S_{ICT} -Zustandes auch um einen polaren Effekt handeln.

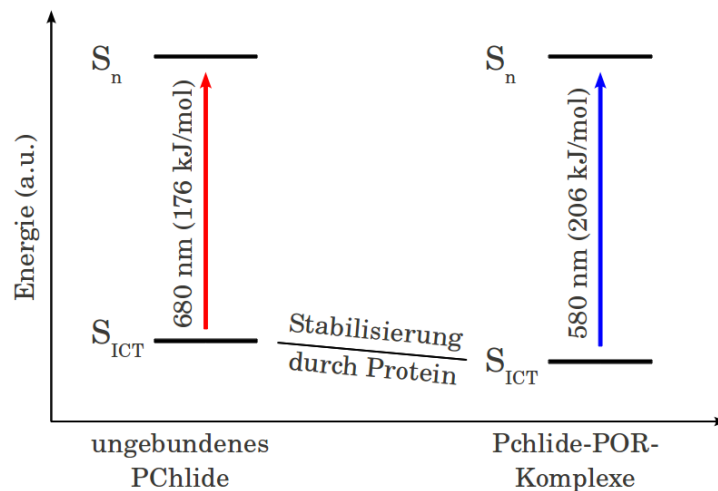


Abbildung 20: Schema für die Stabilisierung des intramolekularen Charge-Transfer-Zustandes (S_{ICT}) durch die Proteinumgebung.

3.2 Vergleich von POR A, POR B und POR ss im Hinblick auf funktionelle und evolutionäre Unterschiede

In allen Organismen, die oxygene Photosynthese betreiben, existieren lichtabhängige POR-Enzyme (LPOR). Neben diesen gibt es noch lichtunabhängige POR-Enzyme (DPOR), die Chlorophyll sowohl im Dunkeln als auch im Licht synthetisieren können und damit vor allem den Aufbau des Photosyntheseapparates im Dunkeln ermöglichen. In ihrer Struktur unterscheiden sich die beiden Enzyme LPOR und DPOR wesentlich voneinander. Die meisten photosynthetisierenden Organismen verfügen sowohl über die LPOR als auch über die DPOR. Eine Ausnahme bilden zum Einen die Angiospermen, die nur das lichtabhängige Enzym enthalten, und zum Anderen die anoxygenen photosynthetisierenden Bakterien, in denen nur das lichtunabhängige Enzym vorkommt. [2]

Aufgrund des Fehlens der LPOR in anoxygenen photosynthetisierenden Bakterien, stellt sich die Frage, ob die LPOR in den oxygenen Cyanobakterien, die sich zusammen mit

der oxygenen Photosynthese vor 2-3 Milliarden Jahren herausgebildet haben [69] [70], evolutionär gesehen, quasi als Prototyp der lichtabhängigen POR-Enzyme zu betrachten ist. Um einen Beitrag zur möglichen evolutionären Rolle eines LPOR-Enzyms aus einem Cyanobakterium zu leisten, werden im Folgenden die katalytischen Eigenschaften eines solchen Enzyms aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp.* - im Nachfolgenden POR ss abgekürzt - mit denen der POR A und POR B aus Gerste (*Hordeum vulgare* L.) verglichen. Diese Analyse schließt auch einen Vergleich zwischen der POR A, dem aktiven Enzym in der Deetiolierungsphase, und der POR B, dem im Licht aktiven Enzym, mit ein, um eine mögliche Erklärung für deren unterschiedliche physiologische Funktion zu finden. Die verschiedenen Aufgaben der POR A und POR B im Verlauf der Entwicklung von Angiospermen ist in Kapitel 1.1 ausführlich dargestellt.

3.2.1 Homologien in der Primärstruktur von POR A, POR B und POR ss

POR ss	-----ME	QPMKPTVIIT	GASSGVGLYG	AKALIDKG-W	HVIMACRNLD	
POR a	-----	---MGVVVIT	GASSGLGLAA	AKALAE TGKW	HVVMACRDFL	
POR b	MQAAAVSAPT	ATPASPAGKK	TVRTGNAIIT	GASSGLGLAT	AKALAESGKW	HVIMACRDYL
POR ss	KTQKVADELG	FPKDSYTIIK	LDLGYLDSVR	RFVAQFRELG	RPLKALVCNA	AVYFPLLDEP
POR a	KASKAAKAAG	MADGSYTMH	LDLASLDSVR	QFVDAFRRAE	MPLDVLVCNA	AIYRPTARTP
POR b	KTARAARAAG	MPKGSYTIWH	LDLASLDSVR	QFVKNVRQLD	MPIDVVVCNA	AVYQPTAKEP
POR ss	LWSADDYELS	VATNHLGHFL	LCNLLLEDLK	ACPDADKRLI	ILGTVTANSK	ELGGKIPIPA
POR a	TFTADGHEMS	VGVNHLGHFL	LARLLMEDLQ	KSDYPSRRMV	IVGSITGNSN	TLAGNVPPKA
POR b	SFTADGFEMS	VGVNHLGHFL	LARELLEDLK	ASDYPSKRLI	IVGSITGNTN	TLAGNVPPKA
POR ss	PPDLGNFEGF	EAGFK--KPI	AMINNKK-FK	SGKAYKDSKL	CNMLTTRELH	RRFHQETGIV
POR a	--SLGDLRGL	AGGLSGASGS	AMIDGDESFD	GAKAYKDSKV	CNMLTMQEFH	RRYHEETGIT
POR b	--NLGDLRGL	AAGLNGVGS	AMIDGAE-FD	GAKAYKDSKV	CNMLTMQEFH	RRYHEETGVT
POR ss	FNSLYPGCVA	DTPLFRNHYS	LFRTIFPWFQ	KNVTKGYVSQ	ELAGERVAMV	VADDKFKDSG
POR a	FSSLYPGCIA	TTGLFREHIP	LFRTLFPFPFQ	KFVTKGFVSE	AESGKRLAQV	VAEPVLTSG
POR b	FASLYPGCIA	TTGLFREHIP	LFRLLFPFPFQ	KYITKGYVSE	EEAGKRLAQV	VSEPSLTSG
POR ss	VHWSWGNROO	AGREAFVQEL	SEQGSDAQKA	QRMWDLSEKL	VGLV	
POR a	VYWSW-NKDS	A---SFENQL	SQEASDPEKA	RKVWELSEKL	VGLA	
POR b	VYWSW-NKNS	A---SFENQL	SEEASDTEKA	RKVWELSEKL	VGLA	

Abbildung 21: Sequenzalignment der POR A, POR B und POR ss. Die rot unterlegten Aminosäuren stellen die identischen, die grau markierten die ähnlichen Aminosäuren dar. Die NADPH-Bindedomäne besteht aus dem markierten GASSGxG-Motiv, die PChlide-Bindungstasche aus dem YKDSK-Motiv.

In Abbildung 21 ist das Alignment der Primärsequenzen der POR A, POR B und POR ss dargestellt. Die jeweils rot markierten Aminosäuren entsprechen den in den drei PORs identischen, die grau markierten den ähnlichen Aminosäuren. Die Ähnlichkeit von Aminosäuren geht auf ihre chemischen Eigenschaften wie zum Beispiel Hydrophobizität, Basizität oder Aromatizität zurück. Die NADPH-Bindungstasche wird von dem GASSGxG-Motiv (Glycin - Alanin - Serin - Serin - Glycin - Leucin bzw. Valin - Glycin) gebildet, die PChlide-Bindedomäne von den Aminosäuren YKDSK (Tyrosin - Lysin - Aspartat - Serin - Lysin). [10] Diese Motive sind in dem Alignment hervorgehoben.

Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen ist in Tabelle 4 dargestellt. Daraus lässt sich entnehmen, dass die größte Sequenzähnlichkeit mit 75 % an identischen und 85 % an ähnlichen Aminosäuren zwischen der POR A und der POR B besteht. Die POR ss besitzt 51 % identische und 68 % bzw. 66 % ähnliche Aminosäuren im Vergleich zur POR A bzw. zur POR B. Sie zeigt in ihrer Primärstruktur die gleiche Übereinstimmung zur POR A wie zur POR B.

Tabelle 4: Sequenzähnlichkeit zwischen der POR A, POR B und POR ss. Die rot gekennzeichneten Werte zeigen die prozentualen Anteile an identischen Aminosäuren, die grau hervorgehobenen die der ähnlichen Aminosäuren.

	POR B	POR ss
POR A	75 %	51 %
	85 %	68 %
POR B		51 %
		66 %

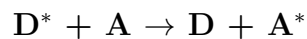
3.2.2 Die NADPH-Bindedomäne von POR A, POR B und POR ss - die Abstände zwischen dem Cofaktor NADPH und einem benachbarten Tryptophan als Kriterium für Analogien in der Tertiärstruktur

Die Tertiärstruktur der lichtabhängigen NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase ist noch ungeklärt, weil bislang weder die Kristallstruktur noch strukturaufklärende NMR-spektroskopische Untersuchungen an der POR vorliegen. Ein Modell für die Tertiärstruktur der POR wurde allerdings auf der Basis von Sequenzhomologien zu einer in ihrer Kristallstruktur aufgeklärten tyrosinabhängigen Oxidoreduktase, die 7 α -Hydrosteroid-Dehydrogenase aus *E. coli*, abgeleitet. [10] [12] Die Sequenzhomologien zu diesem Enzym sind zwar eher gering, aber im Bereich der Substrat- und Cofaktorbindedomäne besteht eine gute Übereinstimmung. Aus der für die POR entwickelten Modellstruktur geht hervor, dass in unmittelbarer Nähe zur NADPH-Bindedomäne ein Tryptophanrest in Förster-Energietransfer-Distanz lokalisiert ist. Vier weitere Tryptophanreste befinden sich an der

Oberfläche des Enzyms, deren Fluoreszenz allerdings durch die Wechselwirkung mit der Lösungsmittelumgebung gelöscht wird. [10]

Um Informationen über eventuell auftretende Unterschiede oder auch Analogien in der Tertiärstruktur in der Nähe der NADPH-Bindungstasche der POR A, POR B und POR ss zu erhalten, wurde überprüft, inwieweit ebenfalls ein Tryptophan in unmittelbarer Nachbarschaft zum NADPH-Bindungsmotiv lokalisiert ist. Ausgehend von der dreidimensionalen Modellstruktur und unter Berücksichtigung der individuellen Sequenz, handelt es sich bei dem in Frage kommenden Tryptophan um Try-27 für die POR A, Try-50 für die POR B und Try-31 für die POR ss. Unter Zuhilfenahme der Förster-Theorie wurde für diese Tryptophane der Abstand zum gebundenen NADPH ermittelt.

Beim Förster-Resonanz-Energietransfer wird Energie strahlungsfrei über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen von einem angeregten Donor (D^*)- auf ein Akzeptormolekül (A) übertragen. [71]



In dem hier beschriebenen Fall fungiert der Tryptophanrest in der POR als Donor und das NADPH als Akzeptor. Eine wichtige Voraussetzung für den Energietransfer ist das spektrale Überlappen des Fluoreszenzspektrums des Donors und des Absorptionsspektrums des Akzeptors (Abbildung 22).

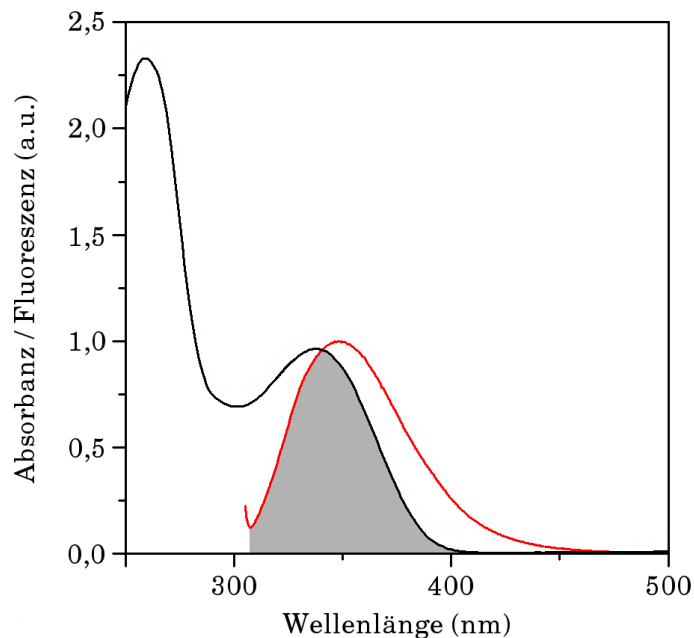


Abbildung 22: Fluoreszenzspektrum der POR A (rot) und Absorptionsspektrum des NADPHs (schwarz). Die grau markierte Fläche zeigt das Überlappungsintegral beider Spektren. Alle Spektren wurden im Messpuffer unter Zusatz von 0,1 % Genapol X-80 als Detergenz registriert.

Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor (r) ergibt sich wie folgt:

$$r = \left(\frac{1}{E} - 1 \right)^{\frac{1}{6}} \cdot R_0 \quad (4)$$

E : Transfereffizienz

R_0 : Försterabstand

Der Försterabstand entspricht dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem der Energietransfer und die Desaktivierung des angeregten Donors über andere Kanäle gleich wahrscheinlich ist. Die Effizienz für den Energietransfer (E) läßt sich berechnen aus:

$$E = 1 - \frac{A_A^{\lambda_{exc}} \cdot F_{DA}^{\lambda_{em}}}{A_{DA}^{\lambda_{exc}} \cdot F_D^{\lambda_{em}}} \quad (5)$$

$A_A^{\lambda_{exc}}$: Absorption des Akzeptors bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{exc} = 295$ nm

$A_{DA}^{\lambda_{exc}}$: Absorption des Akzeptors in Anwesenheit des Donors bei $\lambda_{exc} = 295$ nm

$F_D^{\lambda_{em}}$: Fluoreszenz des Donors bei der Emissionswellenlänge $\lambda_{em} = 350$ nm

$F_{DA}^{\lambda_{em}}$: Fluoreszenz des Donors in Gegenwart des Akzeptors bei $\lambda_{em} = 350$ nm

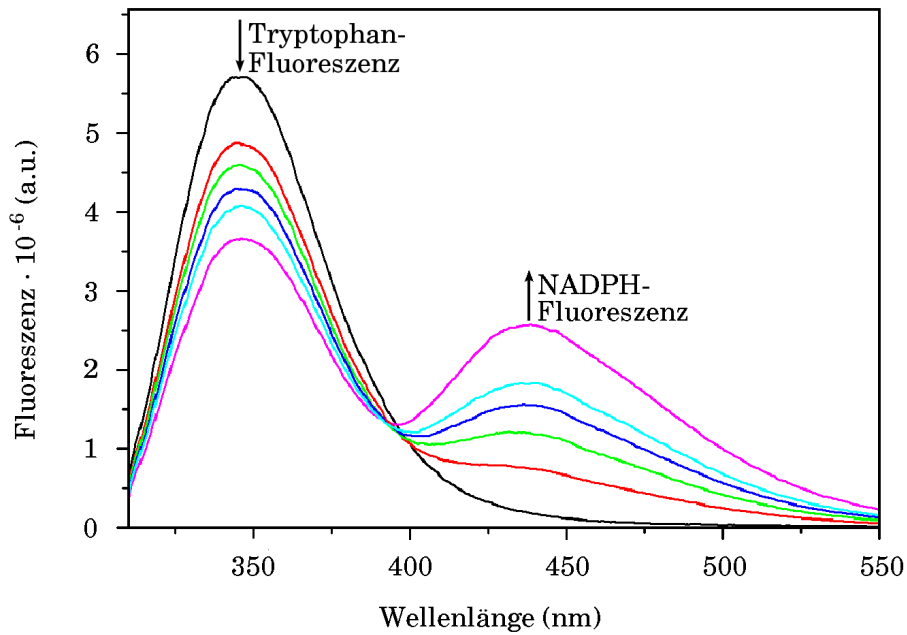


Abbildung 23: Fluoreszenzspektren der POR ss in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an NADPH. Dargestellt sind das Fluoreszenzspektrum der reinen POR (schwarz) und das des POR-NADPH-Komplexes (farbig). Das Verhältnis von POR zu NADPH betrug 1:1 (rot), 1:3 (grün), 1:5 (blau), 1:7 (türkis) und 1:10 (pink). Die POR ss war gelöst im Messpuffer, der 0,1 % Genapol X-80 enthielt. Unter Berücksichtigung der inneren Filtereffekte betrug die Konzentration der POR ss $1,6 \mu\text{M}$.

Abbildung 23 zeigt das Quenchen der Fluoreszenz des Donors in Anwesenheit des Akzeptors. Für den Försterabstand R_0 gilt:

$$R_0 = 9,78 \cdot 10^3 \cdot (\kappa^2 \cdot \Phi_F \cdot J(\lambda))^{\frac{1}{6}} \quad (6)$$

κ^2 : Orientierungsfaktor

Φ_F : Fluoreszenzquantenausbeute des Donors

$J(\lambda)$: Überlappungsintegral

Der Orientierungsfaktor κ^2 bringt die relative Orientierung zwischen dem Übergangsdipolmoment des Donors und des Akzeptors zum Ausdruck. Da dieser aufgrund der fehlenden Raumstruktur für die POR nicht bekannt ist, wird $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ für schnell und isotrop rotierende Moleküle angenommen. Die Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F wurden jeweils experimentell gegenüber Chininsulfat als Referenz bestimmt nach:

$$\Phi_F = \Phi_{St} \cdot \frac{F(\lambda) \cdot A_{St} \cdot n^2}{F(\lambda)_{St} \cdot A \cdot n_{St}^2} \quad (7)$$

Φ_{St} : Fluoreszenzquantenausbeute des Standards Chininsulfat (0,55)

$F(\lambda)$: Fläche unter der Tryptophan-Fluoreszenzbande bei $\lambda_{exc} = 295$ nm

$F(\lambda)_{St}$: Fläche unter der Fluoreszenzbande des Chininsulfats bei $\lambda_{exc} = 348$ nm

A : Absorption des Donors bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{exc} = 295$ nm

A_{St} : Absorption des Chininsulfats bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{exc} = 348$ nm

n^2 : Brechungsindex des Genapol-Messpuffers, in dem der Donor vorliegt (1,7972)

n_{St}^2 : Brechungsindex von Wasser, in dem Chininsulfat vorliegt (1,7769)

Der Brechungsindex des Messpuffers mit 0,1 % Genapol X-80 wurde experimentell über refraktometrische Messungen bestimmt. Das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ ergibt sich aus dem folgenden Zusammenhang:

$$J(\lambda) = \int F_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad (8)$$

$F_D(\lambda)$: auf die Fläche von 1 normiertes Donor-Fluoreszenzspektrum bei $\lambda_{exc} = 295$ nm

$\epsilon_A(\lambda)$: Extinktionskoeffizientenspektrum des Akzeptors

λ^4 : vierte Potenz der Wellenlänge

Tabelle 5 zeigt die experimentell bestimmten Fluoreszenzquantenausbeuten, sowie die nach der Förster-Theorie ermittelten Werte für die Effizienz des Energietransfers vom Tryptophan auf das NADPH, den Försterabstand und den Abstand zwischen dem Tryptophanrest und dem NADPH in der Cofaktorbindungstasche für die einzelnen PORs. Während sich in der POR A und POR ss dieser Abstand nicht unterscheidet, ist er in der

POR B etwas kleiner, so dass hier der Tryptophanrest näher zum NADPH positioniert ist. In wiederholten Experimenten ($n = 4$) wurde der Fehler in der Abstandsabschätzung mit $0,7 \text{ \AA}$ für die POR A, $0,2 \text{ \AA}$ für die POR B und $1,2 \text{ \AA}$ für die POR ss bestimmt. Daraus folgt, dass der geringere Abstand in der POR B real ist. Damit scheint sich die Tertiärstruktur der POR B in der Nähe der NADPH-Bindedomäne von der der anderen PORs zu unterscheiden.

Tabelle 5: Fluoreszenzquantenausbeute (Φ_F), Energietransfereffizienz (E), Försterabstand (R_0) sowie Donor-Akzeptor-Abstand (r) zwischen dem Tryptophanrest und dem gebundenen NADPH in der Nähe der Cofaktorbindungstasche der verschiedenen PORs.

	Φ_F	E [%]	R_0 [\AA]	r [\AA]
POR A	0,01	86	17,7	13,0
POR B	0,01	81	12,3	9,7
POR ss	0,01	84	17,8	13,5

Die hier berechneten Abstände zwischen Tryptophan und NADPH sind in Übereinstimmung mit Werten, die in der Literatur für die POR-Enzyme aus Cyanobakterien berichtet werden. Der Abstand in der POR aus *Synechocystis*, die noch ein Maltosebindepotein-Tag enthält, beträgt 18 \AA . [10] In einer POR aus *Thermosynechococcus elongatus* liegt dieser Abstand bei $21,9 \text{ \AA}$. [43]

3.2.3 Michaeliskonstanten für die Bindung von PChlide und NADPH an die POR A, POR B und POR ss

Stationäre UV/VIS- und Fluoreszenzspektren bei Bindung des PChlides an die POR. Die Bindung des PChlides an die POR ist mittels stationärer UV/VIS-spektroskopischer Methoden bei Raumtemperatur nicht nachweisbar. PChlide im Messpuffer, der pseudoternäre PChlide-POR-NADP⁺-Komplex und der ternäre PChlide-POR-NADPH-Komplex zeigen aufgrund der vibronischen Verbreiterung der Absorptions- und Fluoreszenzbanden bei Raumtemperatur die gleichen Absorptions- und Fluoreszenzspektren. Die entsprechenden Absorptionsspektren sind in Abbildung 24 dargestellt.

Signifikante Änderungen bei der Bindung des PChlides an die POR sind allerdings bei 77 K in den Fluoreszenz- und Fluoreszenzanregungsspektren zu beobachten. Abbildung 25 zeigt diese Spektren des pseudoternären (PChlide-POR-NADP⁺) und ternären (PChlide-POR-NADPH) Komplexes im Vergleich zu denen des ungebundenen PChlides. In den Fluoreszenzspektren zeigt sich eine deutliche Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums von $\lambda_F^{max} = 628 \text{ nm}$ auf $\lambda_F^{max} = 641 \text{ nm}$ für den pseudoternären Komplex und von $\lambda_F^{max} = 629 \text{ nm}$ auf $\lambda_F^{max} = 645 \text{ nm}$ für den ternären Komplex. Zur besseren Veranschaulichung dieses Effekts wurden Differenzspektren aus dem Fluoreszenzspektrum des

pseudoternären bzw. ternären Komplexes und dem des ungebundenen PChlides gebildet (Abbildung 25 A). Daraus ist ersichtlich, dass sich bei Bindung des PChlides an die POR die Intensität der Fluoreszenzbande bei $\lambda_F^{max} = 628$ bzw. 629 nm verringert und eine neue Bande bei $\lambda_F^{max} = 641$ bzw. 645 nm entsteht.

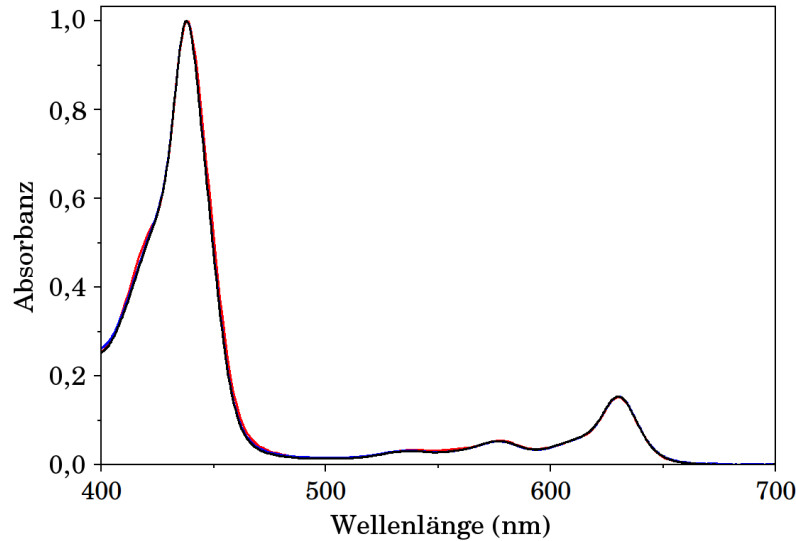


Abbildung 24: Absorptionsspektrum des ungebundenen PChlides im Tritonmesspuffer (schwarz), des pseudoternären PChlide-POR-NADP⁺-Komplexes (blau) und des ternären PChlide-POR-NADPH-Komplexes (rot). Vermessen wurden die POR-Komplexe aus 4 μ M POR A, 1 μ M PChlide und 40 μ M NADP⁺ bzw. NADPH.

Diese Rotverschiebung spiegelt sich auch in den Fluoreszenzanregungsspektren wider, die für die Soretbande bei $\lambda_{em} = 631$ nm und $\lambda_{em} = 644$ nm in Abbildung 25 B und C dargestellt sind. Für den pseudoternären Komplex (Abbildung 25 B) ergeben sich für die Emission bei $\lambda_{em} = 631$ nm zwei Banden mit Peaks bei 441 bzw. 450 nm. Diese Banden verschieben sich hin zu 443 bzw. 453 nm für die Emission bei $\lambda_{em} = 644$ nm. Das entspricht einer Verschiebung von 2-3 nm. Für den ternären Komplex (Abbildung 25 C) beträgt diese Rotverschiebung 5-6 nm. Die beiden Banden sind in dessen Anregungsspektrum für die Emission bei $\lambda_{em} = 631$ nm bei 439 bzw. 448 nm lokalisiert. Für die Emission bei $\lambda_{em} = 644$ nm sind sie auf 445 bzw. 453 nm verschoben.

Aus den Fluoreszenz- und Fluoreszenzanregungsspektren bei 77 K geht somit hervor, dass die Bindung des PChlides an die POR eine bathochrome Verschiebung der Fluoreszenz von 631 nm auf 644 nm hervorruft. Das Auftreten dieser Verschiebung nicht nur im ternären, sondern auch im pseudoternären Komplex verweist auf eine Bindung des PChlides an die POR auch in Gegenwart des NADP⁺s. Dieses Resultat legitimiert die Untersuchungen am pseudoternären Komplex als Modell für die Reaktion am ternären Komplex (Kapitel 3.1.3). Ein analoger Effekt auf die Tieftemperaturfluoreszenz- und Fluoreszenzanregungs-

spektren bei Bindung des PChlides an die POR ist in der Literatur für ein Enzym aus Cyanobakterien beschrieben worden. [65]

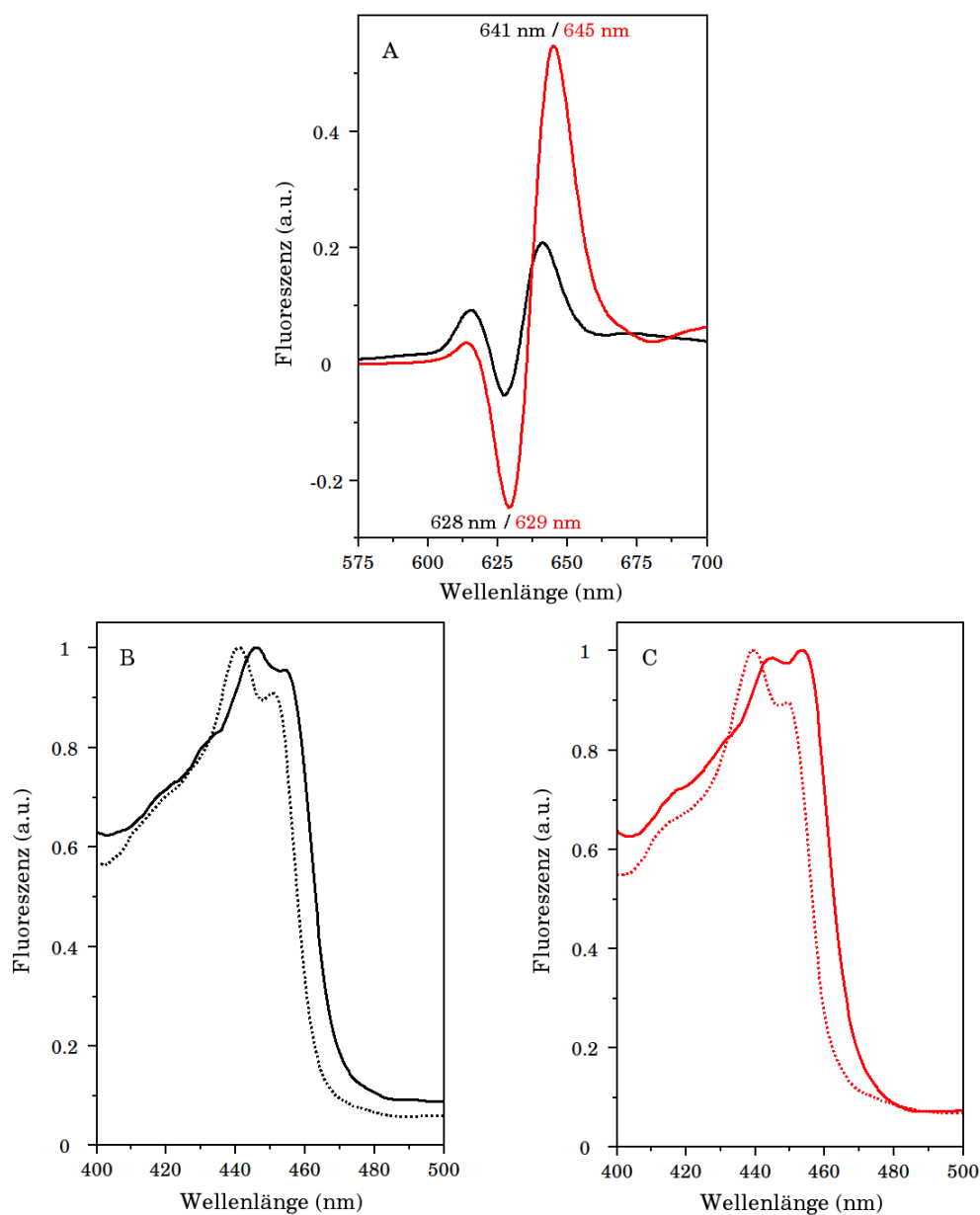


Abbildung 25: Fluoreszenz- und Fluoreszenzanregungsspektren des pseudoternären (PChlide-POR-NADP⁺) und ternären (PChlide-POR-NADPH) Komplexes bei 77 K. A: Differenzspektrum des pseudoternären Komplexes aus 20 μ M PChlide, 50 μ M POR A und 500 μ M NADP⁺ (schwarz) und des ternären PChlide-POR-NADPH-Komplexes gleicher Konzentrationen (rot). Als Referenz für die Differenzspektren diente ungebundenes PChlide im Messpuffer. Fluoreszenzanregungsspektrum des pseudoternären (B) und des ternären Komplexes (C) bei den Emissionswellenlängen $\lambda_{em} = 631$ nm (---) und $\lambda_{em} = 644$ nm (—). Messpuffer: 50 mM Tris/HCl, 0,3 M NaCl, 0,1 % Triton, 60 % Glycerin, 7 mM DTT, pH 7,6.

Bestimmung der Bindungskonstanten für das Substrat PChlide und den Cofaktor NADPH. Zur quantitativen Bestimmung der Bindungskonstanten für das Substrat PChlide und den Cofaktor NADPH an die POR wurden vergleichende Bindungsstudien an der POR A, der POR B und der POR ss durchgeführt. Zur Ermittlung der Bindungskonstanten wurde die Theorie von L. Michaelis und M. Menten herangezogen. [72] Sie erlaubt die Bestimmung der für ein Enzym spezifischen Michaeliskonstante (K_M), die zumeist der Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes entspricht und damit Aussagen über die Bindung des Substrates an das Enzym zulässt.

Der generelle Mechanismus einer enzymkatalysierten Reaktion lässt sich mit folgender Reaktionsgleichung wiedergeben:



E: Enzym

S: Substrat

ES: Enzym-Substrat-Komplex

P: Produkt der enzymatischen Katalyse

k: Geschwindigkeitskonstante

Daraus ergibt sich für die Reaktionsgeschwindigkeit v_0 unter der Bedingung $k_{-2} = 0$:

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad \text{mit} \quad [ES] = \frac{[S] \cdot [E_0]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

[P]: Konzentration des Produktes Chlide

k_2 : Geschwindigkeitskonstante für die Zerfallsreaktion des Enzym-Substrat-Komplexes

[ES]: Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes

[S]: Konzentration des Substrates PChlide

[E_0]: Ausgangskonzentration des Enzyms POR

K_M : Michaeliskonstante, $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

Für den Fall, dass $k_2 \ll k_{-1}$ ist, entspricht die Michaeliskonstante der Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes: $K_M = K_d = \frac{k_{-1}}{k_1}$. Somit lassen sich durch Bestimmung des K_M -Wertes Aussagen über die Substratbindung treffen. Die Michaelis-Menten-Gleichung, die sich aus Gleichung 9 herleitet, lautet:

$$v_0 = \frac{[S] \cdot V_{max}}{K_M + [S]} \quad (10)$$

v_0 : Reaktionsgeschwindigkeit

[S]: Konzentration des Substrates PChlide

V_{max} : maximale Umsatzgeschwindigkeit bei Substratsättigung des Enzyms

K_M : Michaeliskonstante

Zur Ermittlung des K_M -Wertes wird in dieser Arbeit die linearisierte Form nach C. S. Hanes und B. Woolf verwendet:

$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} \cdot [S] + \frac{K_M}{V_{max}} \quad (11)$$

Zur Bestimmung der Michaeliskonstante wurde der PChlide-POR-NADPH-Komplex im Tritonmesspuffer bei $\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$ bestrahlt. Als Anregungslichtquelle diente ein Helium-Neon-Laser. Die Bestrahlungsintensität betrug $1,7 \frac{\text{nmolPhotonen}}{\text{s} \cdot \text{cm}^2}$. Die Konzentration des POR-Enzyms bzw. des Cofaktors NADPH wurde in allen Experimenten konstant gehalten und lag bei $1 \mu\text{M}$ bzw. $10 \mu\text{M}$. Die PChlide-Konzentration wurde zwischen $0,4 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ variiert.

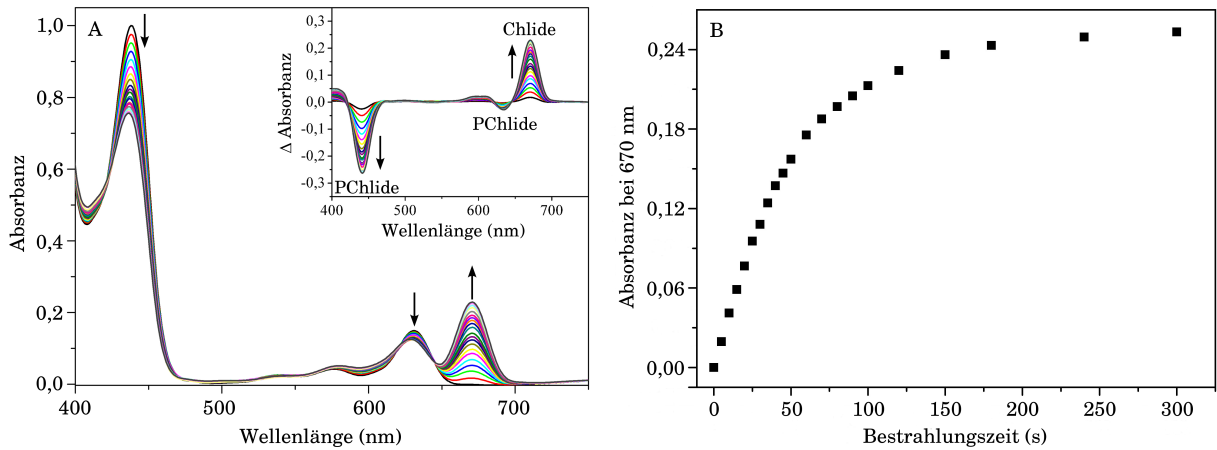


Abbildung 26: Absorptionsspektren nach definierten Bestrahlungszeiten (A) und dazugehörige Kinetik der Chlide-Bildung (B) des ternären POR B-Komplexes. $2,7 \mu\text{M}$ POR B, $1,1 \mu\text{M}$ PChlide und $10 \mu\text{M}$ NADPH wurden im Tritonmesspuffer gelöst und nach definierten Bestrahlungszeiten mit $\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$ im Bereich von $t = 0\text{--}300 \text{ s}$ die UV/VIS-Spektren registriert. Inset: Absorptionsdifferenzspektren zwischen dem bestrahlten und unbestrahlten ternären Komplex der POR B.

Der Reaktionsverlauf der Enzymkatalyse wurde durch Registrierung der Absorptionsspektren im UV/VIS-Bereich nach definierten Bestrahlungszeiten ($t_{n=0} \rightarrow t_n$) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration verfolgt. Abbildung 26 A zeigt als repräsentatives Beispiel für den ternären Komplex der POR B die Absorptionsspektren als Funktion der Bestrahlungszeit. Im Inset sind die Differenzspektren, die aus den Absorptionsspektren zum Zeitpunkt t_n und dem Spektrum für $t = 0$, bei der die Probe unbestrahlt vorlag, dargestellt. In den Differenzspektren ist die Abnahme der PChlide-Konzentration in der Soretbande

bei $\lambda = 438$ nm und in der Q-Bande bei $\lambda = 630$ nm sehr gut zu erkennen. Die Bande bei $\lambda = 670$ nm entspricht dem gebildeten Chlide. Aus der Bildungskinetik des Chlides (Abbildung 26 B) wurde die Anfangsgeschwindigkeit des enzymatischen Umsatzes für eine definierte Substratkonzentration über eine lineare Regressionsanalyse bestimmt. Aus den in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ermittelten Umsatzgeschwindigkeiten ($v_0 = f([\text{PChlide}])$) wurde der Hanes-Woolf-Plot erstellt und aus diesem der K_M -Wert und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} für das betreffende POR-Enzym bestimmt. Abbildung 27 zeigt den Hanes-Woolf-Plot für die drei untersuchten POR-Enzyme.

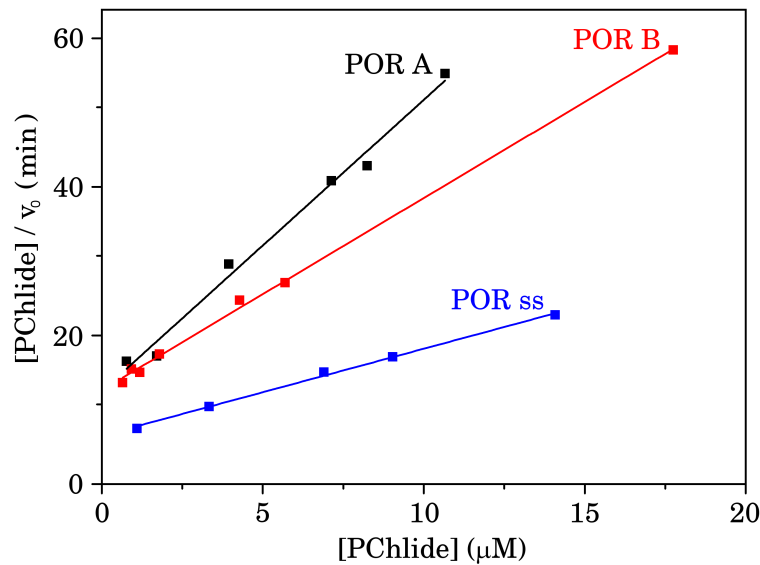


Abbildung 27: Hanes-Woolf-Plot zur Bestimmung der K_M -Werte für die verschiedenen POR-Enzyme.

In Tabelle 6 sind die so erhaltenen V_{max} - und K_M -Werte zusammengestellt. Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten liegen im Bereich von 0,13-0,26 $\mu\text{M}/\text{min}$. Für die Michaeliskonstanten ergeben sich Werte von 3 μM für die POR A, 5 μM für die POR B und 4 μM für die POR ss. Dem steht ein Messfehler, bestimmt in Wiederholungsmessungen ($n = 5$) von 1 μM entgegen. Was bedeutet, dass sich die K_M -Werte für alle drei POR-Enzyme nicht signifikant voneinander unterscheiden. Die Bindungskonstanten für PChlide sind somit in allen drei POR-Enzymen unabhängig von deren evolutionärem Ursprung bzw. physiologischer Funktion annähernd gleich.

Tabelle 6: Michaeliskonstanten (K_M) für die Bindung des PChlides an die POR A, POR B und POR ss sowie die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten (V_{max}) in diesen Enzymen.

	POR A	POR B	POR ss
K_M [μM]	3 ± 1	5 ± 1	4 ± 1
V_{max} [$\frac{\mu\text{M}}{\text{min}}$]	0,13	0,20	0,26

Die für die verschiedenen POR-Enzyme experimentell ermittelten K_M -Werte stehen in guter Übereinstimmung mit K_M -Werten von $1,8 \mu\text{M}$ bzw. $8,6 \mu\text{M}$, die für POR-Enzyme aus Cyanobakterien in der Literatur berichtet werden. [73] [74] Für Cyanobakterien sind außerdem Werte für die Dissoziationskonstante des PChlide-POR-NADPH-Komplexes veröffentlicht. Diese liegen im Bereich von $1,3\text{-}7,7 \mu\text{M}$. [13] [65] [73] Die Dissoziationskonstante unterscheidet sich damit nicht von den publizierten K_M -Werten. Dieser Vergleich macht deutlich, dass K_M -Werte gut als Konstante zur Charakterisierung der Bindung des PChlides an die POR herangezogen werden können. Für die POR aus Cyanobakterien werden in der Literatur auch Werte für die maximale Umsatzgeschwindigkeit bei vollständiger Substratsättigung angegeben. Diese liegen zwischen $0,4\text{-}0,5 \mu\text{M}/\text{min}$. [73] [74] Im Gegensatz zu den POR-Enzymen aus Cyanobakterien ergibt sich eine nur größenordnungsmäßige Übereinstimmung zu K_M -Werten von $0,2\text{-}0,3 \mu\text{M}$, die für ein POR-Enzym aus *Pisum sativum* L. mitgeteilt worden sind. [6] [75]

Für die Beschreibung der Bindung des Cofaktors NADPH an die untersuchten POR-Enzyme wurden ebenfalls die K_M -Werte bestimmt. Bei Bindung des NADPHs an die POR erhöht sich für den Anteil an gebundenem NADPH die Fluoreszenzintensität. [73] Auf diese Eigenschaft wurde zurückgegriffen, um die Konzentration an jeweils gebundenem NADPH über Fluoreszenzmessungen zu ermitteln. Dafür wurde die NADPH-Fluoreszenz im POR-NADPH-Komplex bei $\lambda_{exc} = 340 \text{ nm}$ angeregt und die Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 454 nm , dem Fluoreszenzmaximum, im Vergleich zum freien, ungebundenen NADPH gleicher Konzentration bestimmt. Die aus den beiden NADPH-Fluoreszenzen resultierende Differenz entspricht der Konzentration des an die POR gebundenen NADPHs. Bei der experimentellen Bestimmung der K_M -Werte wird üblicherweise die Substratkonzentration, im vorliegenden Fall die NADPH-Konzentration, bei gleichbleibender Enzymkonzentration variiert. Diese Vorgehensweise erfordert allerdings die Aufnahme der Fluoreszenzspektren des POR-NADPH-Komplexes und parallel dazu die des freien, ungebundenen NADPHs für jede ausgewählte NADPH-Konzentration. Das führt wegen der vergleichsweise geringen Änderungen in der NADPH-Fluoreszenz bei Bindung an die POR zu einem relativ großen Messfehler. Aus diesem Grund wurde die NADPH-Konzentration in allen Messungen bei $1 \mu\text{M}$ konstant gehalten und die Konzentration der untersuchten POR-Enzyme im Bereich von $0,1\text{-}6,0 \mu\text{M}$ variiert.

Zur Ermittlung des K_M -Wertes für die Bindung des NADPHs an die Cofaktorbindedomäne in den untersuchten POR-Enzymen wurde entsprechend der aus der Michaelis-Menten-Kinetik abgeleiteten Beziehung (Gleichung 12) die Fluoreszenzerhöhung als Funk-

tion der Enzymkonzentration in einem Plot dargestellt.

$$\Delta F = \frac{[POR] \cdot \Delta F_{max}}{K_M + [POR]} \quad (12)$$

ΔF : Erhöhung der NADPH-Fluoreszenz bei Bindung an die POR

$[POR]$: Konzentration des POR-Enzyms

ΔF_{max} : maximale Erhöhung der NADPH-Fluoreszenz bei Bindung an die POR

K_M : Michaeliskonstante

Der K_M -Wert wurde daraus über einen Fit der experimentellen Daten mit der Michaelis-Menten-Beziehung (Gleichung 12) über eine nichtlineare Regressionsanalyse abgeschätzt. In Abbildung 28 ist dieser Plot für die drei untersuchten POR-Enzyme einschließlich der berechneten Fitfunktion dargestellt.

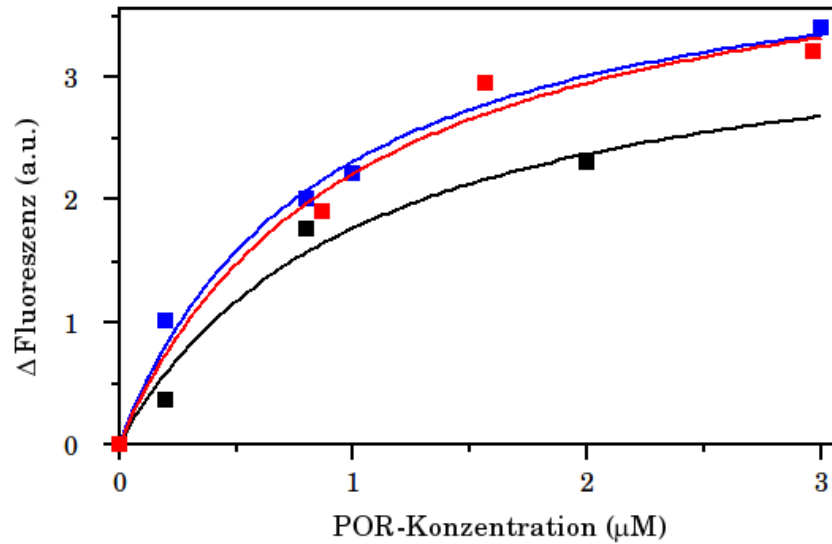


Abbildung 28: Änderung der NADPH-Fluoreszenz bei 454 nm bei Bindung an die POR als Funktion der Konzentration. ■: POR A, ■: POR B und ■: POR ss. Die jeweils farbigen Funktionsverläufe zeigen das Ergebnis des Fits der experimentellen Daten mit der Michaelis-Menten-Gleichung.

Die daraus ermittelten K_M -Werte für die NADPH-Bindung sind in Tabelle 7 zusammengefasst und liegen für alle drei POR-Enzyme im Bereich von $1 \mu\text{M}$. Das bedeutet, dass für die Bindung des Cofaktors NADPH kein signifikanter Unterschied in den drei POR-Enzymen besteht. POR A, POR B und POR ss verfügen über eine vergleichbare Affinität zum Cofaktor. Analog zur Substratbindungsstelle sind offenbar auch die Cofaktorbindedomänen sehr ähnlich und hoch konserviert. Hier scheint es im Vergleich zur POR ss keine evolutionäre Weiterentwicklung in der POR A oder POR B aus Angiospermen zu geben. Die wesentlichen katalytischen Strukturmodule sind anscheinend bereits mit dem

Einsetzen der Chlorophyllbiosynthese in den oxygenen Cyanobakterien hinsichtlich ihrer Substrat- bzw. Cofaktor-Selektivität optimiert.

Tabelle 7: Michaeliskonstanten (K_M) für die Bindung des Cofaktors NADPH an die POR A, POR B und POR ss. Die angegebenen Fehlergrenzen wurden aus mehrfachen Wiederholungsmessungen ($n = 4$) bestimmt.

	POR A	POR B	POR ss
K_M [μM]	$0,7 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,4$

Literaturangaben zu Bindungskonstanten des NADPHs an die POR variieren recht stark. Für ein POR-Enzym aus Cyanobakterien wurde ein K_M -Wert von $0,01 \mu\text{M}$, für die POR aus *Pisum sativum* L. einer von $8,7\text{-}11 \mu\text{M}$ gefunden. [6] [73] [74] [75] Die veröffentlichten Dissoziationskonstanten schwanken ebenfalls, stimmen aber mit den berichteten K_M -Werten überein. Der K_d -Wert für das POR-Enzym aus Cyanobakterien nimmt Werte zwischen $0,01\text{-}0,02 \mu\text{M}$ bzw. $7,4 \mu\text{M}$ an. [10] [13] [74] Wegen der starken Schwankungen in den publizierten Werten ist der Vergleich mit den Resultaten der eigenen Experimenten nicht sinnvoll.

3.2.4 Reaktionsquantenausbeute in der POR A, POR B und POR ss als Funktion der Anregungswellenlänge

Zur weitergehenden Charakterisierung der enzymkatalysierten Reaktion wurden für die POR A, POR B und POR ss Reaktionsquantenausbeuten bestimmt. In einer Voruntersuchung wurde zunächst überprüft, ob es sich bei der Photoreaktion um einen Ein- oder Zwei-Photonenprozess handelt.

Abhängigkeit der Photoreaktion von der Bestrahlungsintensität. Ergebnisse zur Abhängigkeit der enzymkatalysierten Reaktion in der POR von der Bestrahlungsintensität sind mehrfach veröffentlicht worden. Die ersten Untersuchungen an Etioplasmenmembranen von Weizenkeimlingen (*Triticum aestivum* L.) zeigen, dass es sich bei der Photoreaktion um einen Ein-Photonenprozess handelt. [76] Diese Annahme wird durch entsprechende intensitätsabhängige Untersuchungen an Blättern der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.) bestätigt. [77] Demgegenüber ergibt sich aus einer Target-Analyse der ultraschnellen Reaktionsdynamik in einer POR aus Cyanobakterien ein Zwei-Photonenprozess. Danach soll die Anregung mit einem ersten Photon zur Erzeugung einer aktivierten Proteinkonformation in der Umgebung des katalytischen Zentrums führen, die dann bei Absorption eines zweiten Photons eine effektive Photoreaktion erlaubt. [38] Durch die Absorption eines Photons und dem damit verbundenen Umsatz des PChlides

kommt es zur Abnahme der Anzahl der eingesetzten PChlide-Moleküle (N). Diese Abnahme lässt sich wie folgt beschreiben:

$$-\frac{dN}{dt} = \sigma \cdot N \cdot I_{\lambda} \quad (13)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung führt zu der folgenden Gleichung, die einen Ein-Photonenprozess beschreibt:

$$\frac{N_{PChlide_t}}{N_{PChlide_0}} = e^{-\sigma \cdot I_{\lambda} \cdot t} \quad (14)$$

- N : Anzahl der PChlide-Moleküle
 $N_{PChlide_t}$: Anzahl der PChlide-Moleküle zum Zeitpunkt t
 $N_{PChlide_0}$: Anzahl der PChlide-Moleküle zum Zeitpunkt $t = 0$
 t : Bestrahlungszeit
 σ : Photonenabsorptionsquerschnitt
 I_{λ} : Bestrahlungsintensität

Der Photonenabsorptionsquerschnitt σ stellt die Wahrscheinlichkeit, dass das Molekül ein Photon absorbiert, dar. Analog ergibt sich für einen Zwei-Photonenprozess unter der Annahme gleicher Absorptionsquerschnitte für den Ein- und Zwei-Photonenprozess: [78]

$$\frac{N_{PChlide_t}}{N_{PChlide_0}} = (1 + \sigma \cdot I_{\lambda} \cdot t) \cdot e^{-\sigma \cdot I_{\lambda} \cdot t} \quad (15)$$

Zur Analyse der Intensitätsabhängigkeit der Photoreaktion in der POR wurden entsprechende Untersuchungen an der POR A aus Gerste (*Hordeum vulgare* L.) durchgeführt. In den zugrunde liegenden Experimenten wurde der ternäre PChlide-POR-NADPH-Komplex mit einem Helium-Neon-Laser bei $\lambda_{exc} = 633$ nm und einer Bestrahlungszeit von $t = 10$ s mit definierten Lichtintensitäten bestrahlt. Aus den resultierenden Absorptionsspektren wurde der Anteil an nicht umgesetzten PChlide-Molekülen in Abhängigkeit von der Intensität des Bestrahlungslichtes ermittelt. Die Bestrahlungsintensitäten wurden so gewählt, dass innerhalb dieser 10 s maximal gleich viele Photonen auf die Probe auftreffen wie PChlide-Moleküle in der Probe vorhanden sind. Damit wurde gewährleistet, dass jedes Photon die Reaktion potentiell auslösen kann.

Abbildung 29 zeigt den Plot des Anteils an nicht umgesetzten PChlide-Molekülen als Funktion der Bestrahlungsintensität multipliziert mit der Bestrahlungszeit. Daraus ist ersichtlich, dass der Fit für einen Zwei-Photonenprozess die Abhängigkeit der experimentellen Daten von der Bestrahlungsintensität nicht adäquat beschreibt. Das drückt sich auch in dem Korrelationskoeffizienten R^2 von 0,57 für einen Zwei-Photonenprozess aus. Eine gute Anpassung ist dagegen mit dem Fit für einen Ein-Photonenprozess zu erreichen. Der Korrelationskoeffizient R^2 für diesen Fit beträgt 0,99. Es sei angemerkt, dass der Plot

den Bereich widerspiegelt, in dem eine direkte Proportionalität zwischen den absorbierten Photonen und der Abnahme der Substrat-Moleküle infolge der Photoreaktion zum Chlide besteht. Diese Untersuchungen zur Abhängigkeit der enzymkatalysierten Reaktion in der POR A von der Bestrahlungsintensität konnten belegen, dass es sich bei der Photoreaktion um einen Ein-Photonenprozess handelt.

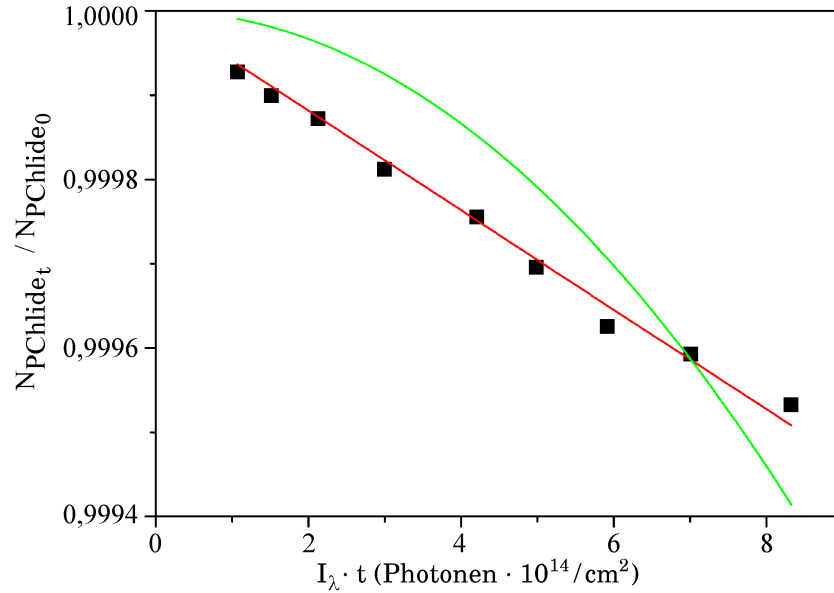


Abbildung 29: Anteil der nicht umgesetzten PChlide-Moleküle als Funktion der Bestrahlungsintensität I_λ multipliziert mit der Bestrahlungszeit t im ternären POR A-Komplex. Die Bestrahlung erfolgte mit $\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$, die Bestrahlungszeit betrug $t = 10 \text{ s}$. Der Fit der experimentellen Daten ist für einen Ein-Photonenprozess (rot, $y = e^{-a \cdot x}$) und einen Zwei-Photonenprozess (grün, $y = (1 + a \cdot x) \cdot e^{-a \cdot x}$) gezeigt. Zusammensetzung des ternären POR A-Komplexes: $69 \mu\text{M}$ POR A, $36 \mu\text{M}$ PChlide und 5 mM NADPH im Tritonmesspuffer.

Reaktionsquantenausbeuten für die Photoreaktion $\text{PChlide} \xrightarrow{h\nu} \text{Chlide}$. Die Reaktionsquantenausbeute ist definiert als das Verhältnis der Anzahl der in einer Photoreaktion umgesetzten Moleküle zur Anzahl der absorbierten Photonen. Sie sagt etwas über die Effizienz einer Reaktion aus und eignet sich daher gut für den weiteren Vergleich der verschiedenen POR-Enzyme in Bezug auf ihren Katalysemechanismus. [79]

Für die Photoreaktion $\text{PChlide} \xrightarrow{h\nu} \text{Chlide}$ gilt folgende Geschwindigkeitsgleichung:

$$v = -\frac{d[\text{PChlide}]}{dt} = \Phi_r \cdot I_{abs} \quad (16)$$

v : Reaktionsgeschwindigkeit
 $[\text{PChlide}]$: Konzentration des PChlides
 t : Bestrahlungszeit

Φ_r : Reaktionsquantenausbeute
 I_{abs} : absorbierte Lichtintensität

Die absorbierte Lichtintensität I_{abs} lässt sich durch folgende Gleichung ausdrücken:

$$I_{abs} = I_{\lambda} \cdot [PChlide] \cdot \epsilon_{\lambda, PChlide} \cdot \frac{1 - 10^{-E_{\lambda}}}{E_{\lambda}} \quad (17)$$

I_{λ} : Bestrahlungsintensität
 $[PChlide]$: Konzentration des PChlides
 E_{λ} : Extinktion bei der Bestrahlungswellenlänge $\lambda_{exc} = 407, 476$ und 647 nm
 $\epsilon_{\lambda, PChlide}$: molarer Extinktionskoeffizient des PChlides bei $\lambda_{exc} = 407, 476$ und 647 nm

Die Substitution von I_{abs} in Gleichung 16 mit dem entsprechenden Term aus Gleichung 17 liefert die folgende Differentialgleichung:

$$-\frac{d[PChlide]}{dt} = \Phi_r \cdot I_{\lambda} \cdot [PChlide] \cdot \epsilon_{\lambda, PChlide} \cdot \frac{1 - 10^{-E_{\lambda}}}{E_{\lambda}} \quad (18)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung unter der Bedingung, dass $\frac{1-10^{-E_{\lambda}}}{E_{\lambda}}$ für $E_{\lambda} < 0,1$ unabhängig von der Bestrahlungszeit ist, führt zu der finalen Gleichung zur Berechnung der Reaktionsquantenausbeuten:

$$\ln \frac{[PChlide]_0}{[PChlide]_t} = \Phi_r \cdot I_{\lambda} \cdot \epsilon_{\lambda, PChlide} \cdot \frac{1 - 10^{-E_{\lambda}}}{E_{\lambda}} \cdot t \quad (19)$$

$[PChlide]_0$: Konzentration des PChlides zum Zeitpunkt $t = 0$

$[PChlide]_t$: Konzentration des PChlides zum Zeitpunkt t

Ausgehend von dieser Beziehung wurden für die POR A, POR B und POR ss die Reaktionsquantenausbeuten bestimmt. Um die Abhängigkeit der Reaktionsquantenausbeuten von der Anregungswellenlänge zu ermitteln, wurden diese für verschiedene Bestrahlungswellenlängen im Bereich der Soret- ($\lambda_{exc} = 407$ und 476 nm) und Q-Absorptionsbande ($\lambda_{exc} = 647$ nm) bestimmt (siehe Abbildung 8 A Kapitel 3.1.1). Zur experimentellen Bestimmung der Reaktionsquantenausbeuten wurde die Änderung der Konzentration des an das POR-Enzym gebundene PChlides bei der jeweiligen Bestrahlungswellenlänge als Funktion der Zeit gemessen. Als Bestrahlungslichtquelle diente ein Kryptonionen-Laser. Die Bestrahlungsintensitäten lagen im Bereich von einigen Hundert $\frac{pmol \text{ Photonen}}{s \cdot cm^2}$. Die für die Auswertung benötigten Extinktionskoeffizienten des PChlides wurden aus den stationären Absorptionsspektren bestimmt und betrugen $\epsilon_{\lambda, PChlide}(647 \text{ nm}) = 9228 \frac{l}{mol \cdot cm}$, $\epsilon_{\lambda, PChlide}(476 \text{ nm}) = 7412 \frac{l}{mol \cdot cm}$ und $\epsilon_{\lambda, PChlide}(407 \text{ nm}) = 104500 \frac{l}{mol \cdot cm}$. Die Bestimmung der Quantenausbeute aus dem experimentell gemessenen Reaktions-Zeitverlauf erfolgte entsprechend Gleichung 19 aus dem Anstieg der Geraden im Plot

$\ln \frac{[PChlide]_0}{[PChlide]_t} / I_\lambda \cdot \epsilon_{\lambda, PChlide}$ gegen die Bestrahlungszeit t . In Abbildung 30 ist dieser Plot für die verschiedenen POR-Enzyme bei einer Bestrahlungswellenlänge von $\lambda_{exc} = 647$ nm dargestellt. Daraus lässt sich entnehmen, dass der Anstieg der Geraden für die POR A und die POR ss ähnlich ist, was auch ähnliche Reaktionsquantenausbeuten impliziert. Der Plot für die POR B zeigt einen sichtlich größeren Anstieg der Geraden und verweist damit auf eine deutlich höhere Reaktionsquantenausbeute gegenüber der POR A und POR ss.

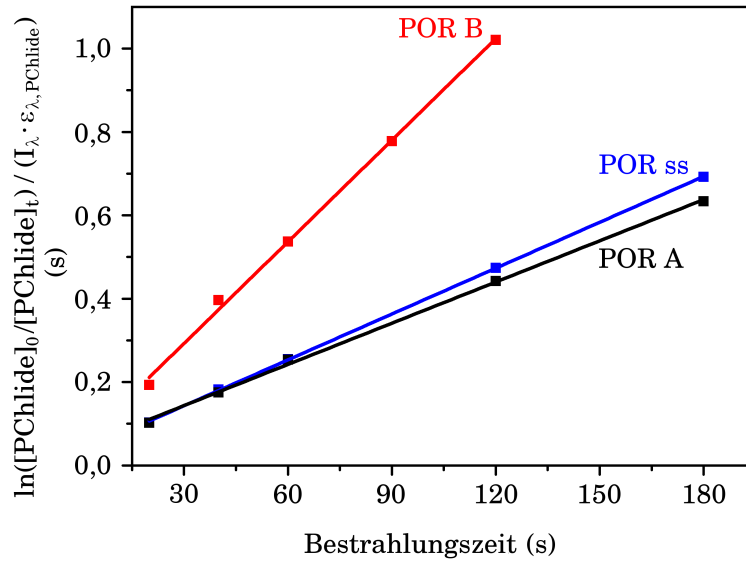


Abbildung 30: Plot zur Bestimmung der Reaktionsquantenausbeute für die POR A, POR B und POR ss bei der Bestrahlungswellenlänge $\lambda_{exc} = 647$ nm. Zusammensetzung des ternären POR-Komplexes: 5 μ M POR, 0,5 μ M PChlide, 50 μ M NADPH im Tritonmesspuffer.

In Abbildung 31 sind für die POR A die Reaktions-Zeitverläufe für verschiedene Anregungswellenlängen verglichen. Gezeigt sind wiederum die Plots $\ln \frac{[PChlide]_0}{[PChlide]_t} / I_\lambda \cdot \epsilon_{\lambda, PChlide}$ gegen die Bestrahlungszeit t . Wie dem Anstieg der Geraden im Plot zu entnehmen ist, führt die Bestrahlung mit $\lambda_{exc} = 647$ nm zu einer deutlich höheren Reaktionsquantenausbeute als die im blauen Spektralbereich bei $\lambda_{exc} = 407$ bzw. 476 nm. Dieselbe Abhängigkeit von der Bestrahlungswellenlänge ergibt sich auch für die POR B und POR ss. In Tabelle 8 sind die für alle drei POR-Enzyme ermittelten Reaktionsquantenausbeuten bei den untersuchten Anregungswellenlängen zusammengestellt. Daraus geht hervor, dass für alle drei untersuchten POR-Enzyme die Reaktionsquantenausbeute bei Anregung in die Q-Absorptionsbande deutlich größer ist als bei Anregung in die Soretbande.

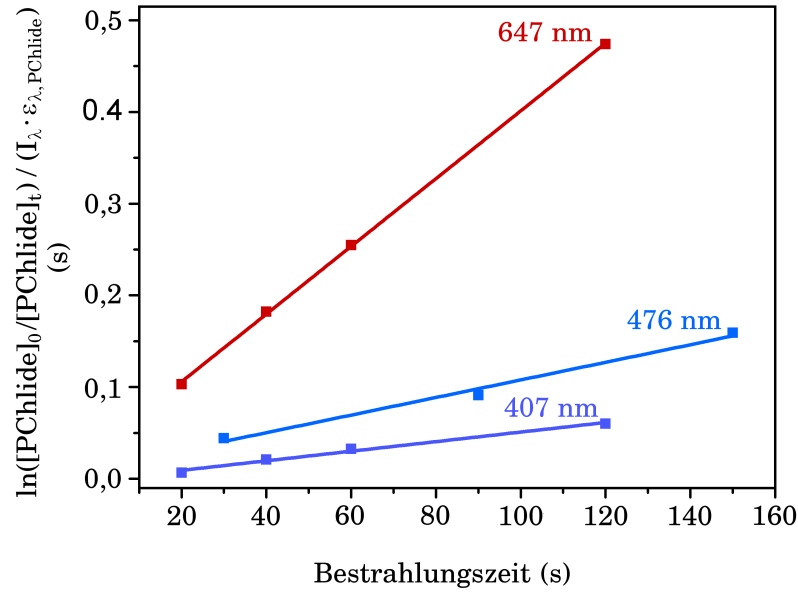


Abbildung 31: Plot zur Bestimmung der Reaktionsquantenausbeute für die POR A in Abhängigkeit von der Bestrahlungswellenlänge $\lambda_{exc} = 407, 476$ und 647 nm. Experimentelle Details wie in Abbildung 30.

Tabelle 8: Reaktionsquantenausbeute (Φ_r) für die POR A, POR B und POR ss bei einer Bestrahlungswellenlänge von $\lambda_{exc} = 407, 476$ und 647 nm. Die angegebene Fehlergrenze der jeweiligen Reaktionsquantenausbeute wurde durch Wiederholungsmessungen ($n = 3$) bestimmt.

Bestrahlungswellenlänge	Φ_r (POR A)	Φ_r (POR B)	Φ_r (POR ss)
$\lambda_{exc} = 407$ nm	$0,07 \pm 0,001$	$0,23 \pm 0,033$	$0,05 \pm 0,001$
$\lambda_{exc} = 476$ nm	$0,15 \pm 0,005$	$0,24 \pm 0,027$	$0,08 \pm 0,004$
$\lambda_{exc} = 647$ nm	$0,33 \pm 0,009$	$0,73 \pm 0,037$	$0,36 \pm 0,012$

Als Ursache für diesen Effekt könnte folgender Sachverhalt verantwortlich gemacht werden. In angiospermen Pflanzen absorbieren die photosynthetischen Pigmente (Chlorophyll a, Chlorophyll b, akzessorische Pigmente) hauptsächlich violettes, blaues, grünes und rotes Licht aus dem Sonnenspektrum. Das bedeutet, dass den Pflanzen, die im Schatten anderer Pflanzen wachsen, nur das transmittierte Licht, das einen hohen Anteil an dunkelrotem Licht aufweist, zur Verfügung steht. [80] [81] Vergleichbare Belichtungsverhältnisse bestehen auch in dichten Pflanzenbeständen. Genauere Aussagen über Lichtqualitätsgradienten lieferten Untersuchungen in Wäldern und Wiesen. [82] Diese zeigten in der Region mit Lichtflecken eine annähernd konstante Strahlungsintensität zwischen $\lambda = 450$ - 800 nm mit einem kleinen Maximum bei $\lambda = \sim 650$ nm. Im Gegensatz dazu kommt es in der Schattenregion generell zu einer starken Abnahme der Lichtintensität. Außerdem weist das Lichtspektrum des Schattens zwischen $\lambda = 400$ - 700 nm fast keinen, zwischen $\lambda = 700$ - 800 nm

hingegen einen hohen Anteil an elektromagnetischer Strahlung auf. Des Weiteren hängt das Sonnenlichtspektrum von äußeren Einflüssen ab. So zeigt es bei Nebel und untergehender Sonne einen sehr hohen Beitrag des roten, aber nur einen geringen Anteil des blauen Lichtes. [83] Dieser Lichtqualitätsgradient bietet eine Erklärung für die biologische Relevanz der höheren Effizienz der Photoreaktion im roten Spektralbereich. Die höhere Reaktionsquantenausbeute gewährleistet so eine hinreichende Chlorophyllsynthese auch in Schattenpflanzen, an nebligen Tagen oder in den Abendstunden.

Die POR B zeigt bei allen Bestrahlungswellenlängen eine in etwa doppelt so hohe Reaktionsquantenausbeute wie die POR A oder die POR ss. Wie die Bindungsstudien in Kapitel 3.2.3 belegen, bestehen keine signifikanten Unterschiede in den Bindungskonstanten für das PChlide oder das NADPH in den drei POR-Enzymen. Das heißt, weder die Bindung des Substrates PChlide noch des Cofaktors NADPH in die entsprechende Bindungstasche der POR können für die höhere Reaktionsquantenausbeute der POR B verantwortlich gemacht werden.

Wie bereits erwähnt, wird die POR A im Dunkeln exprimiert und ist in der Deetiolierungsphase aktiv, während die POR B das im Licht aktive Enzym repräsentiert. Die höhere Reaktionsquantenausbeute der POR B könnte somit den hohen Bedarf an Chlorophyll über die durch die POR B induzierte Reduktion des PChlides im Licht sicherstellen. Des Weiteren kann bedingt durch die hohe Reaktionsquantenausbeute eine Akkumulation des PChlides vermieden bzw. drastisch eingeschränkt werden. Unter den Bedingungen der oxygenen Photosynthese hätte eine solche Akkumulation photosensibilisierte Oxidationen durch Singulett-Sauerstoff zur Folge, die die photosynthetischen Reaktionszentrenkomplexe zerstören würde. In diesem Zusammenhang wäre der POR B auf Grund der hohen Reaktionsquantenausbeute eine spezielle photoprotektive Rolle zuzuschreiben.

Die in Tabelle 8 aufgezeigten Reaktionsquantenausbeuten stehen in guter Übereinstimmung mit Werten, die bisher in der Literatur publiziert sind. Die unter in vitro Bedingungen gemessene Reaktionsquantenausbeute für die Photoreaktion in einem ternären POR-Komplex aus Gerste (*Hordeum vulgare* L.) liegt zwischen 0,4-0,5 bei einer Bestrahlungswellenlänge von $\lambda_{exc} = 640$ nm. Die gleichen Werte finden sich bei in vivo Messungen an im Dunkeln gewachsenen Gerstenblättern. [84] Da nach Reinbothe et al. [33] in den Etioplasten der Gerste die POR-Enzyme zu lichtsammelnden POR A/POR B-Aggregaten assoziiert sind, liegt der Schluss nahe, dass es sich bei den oben aufgeführten Reaktionsquantenausbeuten um einen Mittelwert der hier unter in vitro Bedingungen am isolierten Enzym bestimmten Reaktionsquantenausbeuten von 0,33 für die POR A und 0,73 für die POR B handelt. Dieser Mittelwert liegt für fünf POR A- und einen POR B-Komplex

bei 0,4. Das entspricht exakt dem Literaturwert. Weiterhin wurde für ein exprimiertes POR-Enzym aus einem Cyanobakterium (*Synechocystis*) eine Reaktionsquantenausbeute von 0,21 bei $\lambda_{exc} = 642$ nm bestimmt. [65] Dieser Wert ist der in dieser Arbeit für die POR ss ermittelten Reaktionsquantenausbeute von 0,36 ähnlich.

Die enzymatischen Umsätze der Photoreaktion sind für die einzelnen POR-Enzyme bei allen Anregungswellenlängen gleich groß. Der Umsatz für die POR A-katalysierte Reaktion liegt bei 59 % für $\lambda_{exc} = 407$ nm, bei 58 % für $\lambda_{exc} = 476$ nm und bei 56 % für $\lambda_{exc} = 647$ nm. Die geringen Abweichungen sind den Messungenauigkeiten zuzuschreiben. Das bedeutet, dass das Reaktionsgleichgewicht unabhängig von der Bestrahlungswellenlänge ist. Die Anregungswellenlänge hat einzig einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Daraus ergibt sich, dass sich das Reaktionsgleichgewicht bei Anregung in die Q-Bande schneller einstellt als das bei Anregung in die Soretbande der Fall ist.

Reaktionsdynamik im pseudoternären PChlide-POR-NADP⁺-Komplex bei Anregung in die Soret- und Q-Absorptionsbande. Die Ursache für die Abhängigkeit der Reaktionsquantenausbeuten von der Bestrahlungswellenlänge liegt augenscheinlich schon in der sehr frühen Reaktionsdynamik, die unmittelbar auf die Lichtabsorption des an die POR-gebundenen PChlides folgt. Daraus lassen Ergebnisse aus transienten Absorptionsmessungen am pseudoternären Komplex bei Anregung in die Soret- und Q-Absorptionsbande schließen.

Wie in Kapitel 3.1.3 dargelegt, erfolgt im PChlide-POR-NADP⁺-Komplex eine Desaktivierung der angeregten Franck-Condon-Zustandspopulation über zwei Reaktionskanäle ebenso wie im ungebundenen PChlide (Abbildung 12 Kapitel 3.1.1). Von diesen führt der reaktive Kanal zur Bildung eines intermediären Zwischenproduktes in Form eines intramolekularen Charge-Transfer-Zustandes (S_{ICT}), der einen Ladungstransferzustand beschreibt, in dem die C(13')=O Gruppe des Cyclopentanonrings Elektronendichte aus dem Porphyrinringsystem abzieht. Da eine solche Ladungsverschiebung die Reduktion der C17-C18-Doppelbindung im Porphyrinringsystem im weiteren Verlauf der Enzymkatalyse begünstigen sollte, wird der S_{ICT} -Zustand auch im ternären PChlide-POR-NADPH-Komplex als wichtiges Intermediat betrachtet. Parallel zum reaktiven Kanal wird über den nicht reaktiven Kanal der S_1 -Zustand bevölkert, von dem aus über ein *intersystem crossing* der Triplettzustand besetzt wird. Da die Fluoreszenzquantenausbeute des pseudoternären Komplexes von $\Phi_F = 0,09$ nur sehr gering ist und auch keine merkliche Wiederbevölkerung des Grundzustandes bei der Entvölkerung des angeregten S_1 -Zustandes zu beobachten ist, ist die Desaktivierung über den nicht reaktiven Kanal insbesondere in den Triplettzu-

stand der Konkurrenzprozess zur eigentlichen Photoreaktion. Unter der Annahme, dass sich auch der ternäre PChlide-POR-NADPH-Komplex mit diesem Reaktionsmodell (Abbildung 12 Kapitel 3.1.1) beschreiben lässt, sollte eine höhere Reaktionsquantenausbeute bei Anregung in die Q-Bande mit einer Kanalisierung der Anregungsenergie in den reaktiven Kanal und einem deutlich reduzierten *intersystem crossing* in den Triplettzustand einhergehen. Umgekehrt ist bei einer kleineren Reaktionsquantenausbeute als Folge der Anregung in die Soretbande eine stärkere Bevölkung des Triplettzustandes zu erwarten.

Genau dieses Ergebnis tritt ein, wenn die Bevölkung des Triplettzustandes in transienten Absorptionsmessungen beobachtet wird. In Abbildung 32 A sind die transienten Absorptionsspektren des pseudoternären Komplexes, die aus einer Anregung in die Soret- ($\lambda_{exc} = 400$ nm) und in die Q-Bande ($\lambda_{exc} = 630$ nm) nach einer Verzögerungszeit von 1,4 ns resultieren, dargestellt. Diese Spektren sind auf die gleiche Anzahl angeregter Moleküle normiert. Die positiven Absorptionsänderungen zwischen 490 und 550 nm sind der Absorption des Triplettzustandes zuzuordnen. [54] Der Vergleich der Intensitäten in dieser transienten Absorptionsbande zeigt eine geringere Bevölkung des Triplettzustandes bei Anregung in die Q- im Gegensatz zur Soretbande. Dies zeigt, dass das Ausmaß der Triplettbevölkung von der Anregungswellenlänge abhängt.

Offenbar unterscheidet sich auch die Reaktionsdynamik, die in der Population des Triplettzustandes mündet, bei Anregung in die Q-Bande von der in die Soretbande. Das geht aus Abbildung 32 B hervor. Diese zeigt die Differenz in den transienten Absorptionen, die aus der Subtraktion des transienten Absorptionsspektrums, das 800 fs nach der elektronischen Anregung zu beobachten ist, von dem, das sich bereits nach 150 fs einstellt, resultiert. Während nach der Anregung in die Q-Bande mit $\lambda_{exc} = 630$ nm keine typische Triplettabsorption zwischen 490 und 550 nm auftritt, taucht diese nach Anregung in die Soretbande bereits zu frühen Zeiten im Differenzspektrum auf. Eine Bevölkung des Triplettzustandes im nicht reaktiven Kanal führt über die Besetzung des angeregten S_1 -Zustandes und ist folglich mit einer Zeitkonstante, die im Bereich der ns-Lebensdauer des S_1 -Zustandes liegt, zu erwarten. Die im Gegensatz dazu unmittelbar auf die elektronische Anregung in die Soretbande folgende Bevölkung des Triplettzustandes legt den Schluss nahe, dass das *intersystem crossing* von höher angeregten elektronischen / vibronischen Zuständen ausgeht.

Die Ergebnisse der zeitaufgelösten Untersuchungen belegen damit, dass die Unterschiede in den Reaktionsquantenausbeuten ihren Ursprung in der sehr frühen Reaktionsdynamik haben, die offenbar über die Kanalisierung der Anregungsenergie in den reaktiven oder nicht reaktiven Kanal entscheidet.

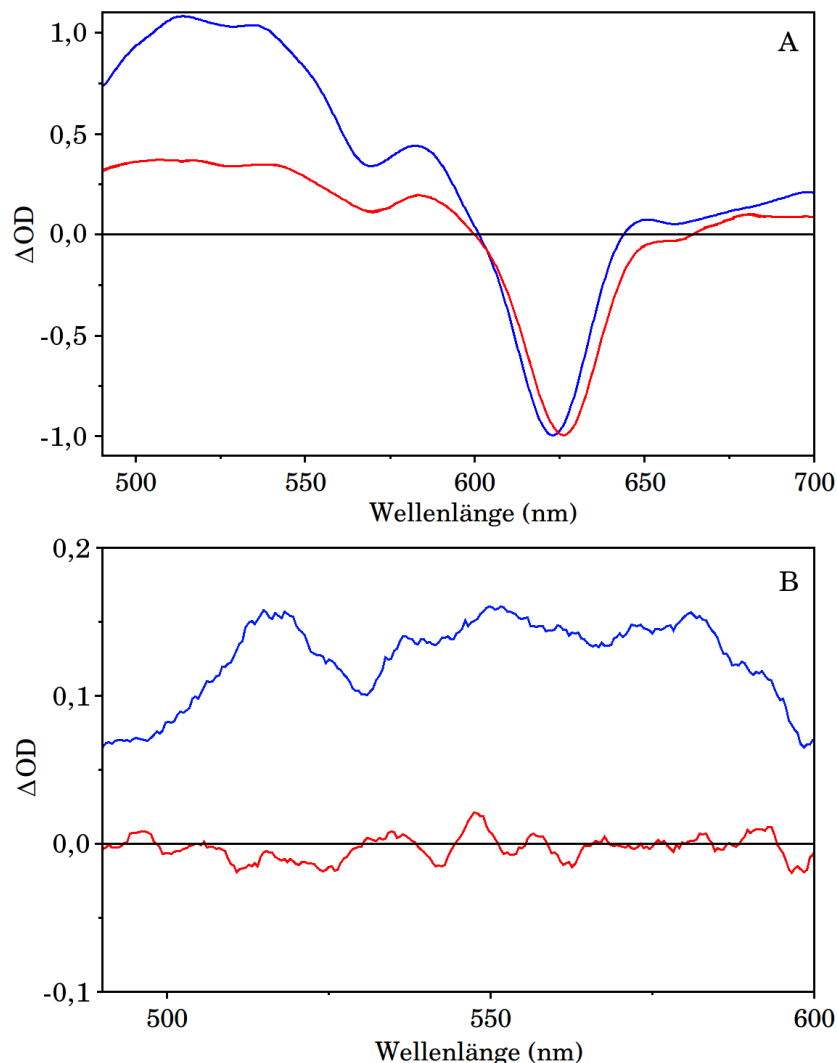


Abbildung 32: A: Transiente Absorptionsspektren des pseudoternären PChlide-POR-NADP⁺-Komplexes nach Anregung in die Soretbande mit $\lambda_{exc} = 400$ nm (blau) und Q-Bande mit $\lambda_{exc} = 630$ nm (rot). Die Spektren sind nach einer Verzögerungszeit von $t = 1,4$ ns gezeigt. B: Differenz der transienten Absorptionsspektren nach Verzögerungszeiten von $t_1 = 800$ fs und $t_2 = 150$ fs nach Anregung mit $\lambda_{exc} = 400$ nm (blau) und $\lambda_{exc} = 630$ nm (rot). Zusammensetzung des pseudoternären Komplexes: 0,1 mM POR A, 0,04 mM PChlide und 1 mM NADP⁺ im Tritonmesspuffer.

3.2.5 Auswirkungen von Punktmutationen in der PChlide-Bindungstasche auf die Enzymaktivität der POR A und POR B

Wie in Kapitel 1.2 dargestellt, weist die POR Sequenzähnlichkeiten zur Familie der sogenannten *RED* Enzyme (Reduktasen, Epimerasen und Dehydrogenasen) auf. [9] [10] [19] Wie diese enthält die POR im aktiven Zentrum das hochkonservierte Substratbindungsmotiv Tyr-x-x-Lys. Beide Aminosäurereste sind kritisch für die Enzymkatalyse, was in dem in Kapitel 1.1, Abbildung 2 diskutierten Reaktionsmechanismus resultiert. [6] [7] [8] [9] Darüber hinaus soll dem Tyrosin eine Rolle bei der Stabilisierung des elektronisch ange-

regten Zustandes im PChlide-POR-NADPH-Komplex zukommen. [8] Außer dem Tyrosin und Lysin stehen auch hochkonservierte Cysteinreste im engen Kontakt zur katalytisch aktiven Seite. Zumindest soll einer dieser Cysteinreste an der Ausbildung eines Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerks beteiligt sein, über das letztendlich der Protonentransfer auf das C18 der zu reduzierenden C17-C18-Doppelbindung abgewickelt wird. [13]

Punktmutationen im Substratbindungsmotiv der POR A und POR B. In den drei untersuchten POR-Enzymen (POR A, POR B und POR ss) sind nicht nur das hochkonservierte Tyrosin und Lysin in der Substratbindungstasche lokalisiert. Die PChlide-Bindedomäne wird vielmehr von einem Pentapeptid gleicher Sequenzabfolge (Tyr - Lys₁ - Asp - Ser - Lys₂) gebildet. Um über die Funktion des Tyrosins und Lysins hinausführend einen Einblick in die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren für die Enzymkatalyse zu gewinnen, wurde die Bindungstasche durch spezifische Punktmutationen verändert. Um sterische Effekte auszuschließen, erfolgte nur ein Austausch zwischen gleich großen Aminosäuren.

Das PChlide-Bindungsmotiv setzt sich ausschließlich aus polaren Aminosäuren zusammen. Durch den Austausch der polaren mit unpolaren Aminosäuren wie Phenylalanin, Isoleucin, Methionin und Alanin, sollte der Einfluss von Aminosäuren mit Tendenz zur Ausbildung zur Wasserstoffbrückenbindung sowie der Einfluss des polaren Charakters der Bindungstasche an sich auf die Enzymaktivität überprüft werden. Der Hintergrund für die Fokussierung auf die genannten Eigenschaften besteht darin, dass die Photoreaktion auf Basis der Ergebnisse aus den transienten Absorptionsmessungen (Kapitel 3.1.3) über einen intramolekularen Charge-Transfer-Zustand (S_{ICT}) führt. Dessen Bildung ist zum einen von der Polarität der Umgebung abhängig [53], indem dieser Komplex in einem polaren Umfeld über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen stabilisiert werden kann. Zum anderen kann eine Stabilisierung auch über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen eintreten.

Tabelle 9 zeigt die in die POR A und POR B eingeführten Punktmutationen. Von den dort aufgeführten Mutanten sind bisher in der Literatur nur die mit ausgetauschtem Tyrosin- und Lysinrest beschrieben. [6] [8] [9] Über die Funktion der anderen Aminosäuren ist bislang nichts bekannt. Da es sich bei der POR B überhaupt um den ersten Eingriff in die Substratbindungstasche handelt, wurden sukzessiv alle Aminosäuren im PChlide-Bindungsmotiv ausgetauscht. Demgegenüber erfolgte in der POR A die gleichzeitige Modifikation von zwei bzw. drei Aminosäuren, um so die Relevanz der Polarität in der Bindungstasche für die Enzymkatalyse aufzufinden.

Tabelle 9: Übersicht über die in die POR A und POR B eingeführten Punktmutationen in der PChlide-Bindungstasche (Tyr - Lys₁ - Asp - Ser - Lys₂).

Punktmutationen an POR A	Punktmutationen an POR B
Tyr ₂₁₅ → Phe	Tyr ₂₁₂ → Phe
Ser ₂₁₈ → Ala	Lys ₂₁₃ → Ile
Lys ₂₁₆ → Ile, Asp ₂₁₇ → Met	Asp ₂₁₄ → Met
Asp ₂₁₇ → Met, Lys ₂₁₉ → Ile	Ser ₂₁₅ → Ala
Lys ₂₁₆ → Ile, Asp ₂₁₇ → Met, Ser ₂₁₈ → Ala	Lys ₂₁₆ → Ile

Enzymaktivität der Serinmutante. Bei allen Mutanten ist ein dramatischer Aktivitätsverlust zu beobachten (Tabelle 11). Zur Abschätzung der Auswirkungen der ersetzten Aminosäuren auf die Enzymkatalyse wurden die Bindungskonstante für das PChlide und die Reaktionsquantenausbeute für die PChlide-Reduktion bestimmt. Leider konnten wegen des massiven Aktivitätsverlustes nur akkurate Werte für die Serinmutante ermittelt werden.

Die Reaktionsquantenausbeute wurde analog zu der für die Wildtyp-Enzyme (siehe Kapitel 3.2.4) gemessen und berechnet. Für die Serinmutante der POR A beträgt diese Reaktionsquantenausbeute bei der Bestrahlung mit $\lambda_{exc} = 407$ nm nur noch $0,05 \pm 0,03$ %, für $\lambda_{exc} = 476$ nm liegt sie bei $0,1 \pm 0,07$ % und für $\lambda_{exc} = 647$ nm bei $0,9 \pm 0,07$ %. Das entspricht nur 1-3 % der Reaktionsquantenausbeute des Wildtyps.

Zur Ermittlung der Bindungskonstanten wurde wiederum dieselbe experimentelle Vorgehensweise und Analyse der Messdaten wie in den Wildtyp-Enzymen angewendet (Kapitel 3.2.3). In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der PChlide-Bindungsstudie für die Serinmutante der POR A und POR B im Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen zusammengestellt. In der POR A hat die Serinmutante den gleichen K_M -Wert wie der Wildtyp, aber eine etwas geringere maximale Umsatzgeschwindigkeit. In der Serinmutante der POR B bestehen gegenüber dem Wildtyp kaum Unterschiede im K_M -Wert und der Maximalgeschwindigkeit, wenn der Messfehler berücksichtigt wird. Dieser ist in den zugrunde liegenden Experimenten aufgrund der nur geringen Enzymaktivität relativ hoch, dennoch ergeben sich aus diesen Ergebnissen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Serinmutanten und den zugehörigen Wildtyp-Enzymen. Das Serin in der Substratbindungstasche hat demzufolge keinen Einfluss auf die Bindung des PChlides. Wie aber aus der deutlichen Abnahme der Reaktionsquantenausbeute hervorgeht, beeinflusst es offenbar nachdrücklich die Photochemie der PChlide-Reduktion.

Tabelle 10: Michaelis-Konstanten (K_M) und maximale Umsatzgeschwindigkeiten (V_{max}) für die Serinmutante der POR A und POR B im Vergleich zu dem jeweiligen Wildtyp. Die angegebenen Fehlergrenzen wurden durch Wiederholungsmessungen ($n = 3$) bestimmt.

POR-Form (Mutation)	K_M [μM]	V_{max} [$\frac{\mu M}{min}$]
POR A Wildtyp	3 ± 1	0,13
POR A (Ser ₂₁₈ → Ala)	2 ± 1	0,04
POR B Wildtyp	5 ± 1	0,20
POR B (Ser ₂₁₅ → Ala)	1 ± 1	0,23

Steady-state-Umsatzgeschwindigkeit in weiteren Mutanten der POR A und POR B. Aufgrund der geringen Enzymaktivität der weiterhin erzeugten POR-Mutanten durch Veränderungen im PChlide-Bindungsmotif (Tyr-Lys₁-Asp-Ser-Lys₂) wurde ein Vergleich mit den Wildtyp-Enzymen auf Basis des beobachteten Reaktionsumsatzes und der Umsatzgeschwindigkeit vorgenommen. Um sicherzustellen, dass in diesen Experimenten die jeweils gleiche Konzentration an Enzym-Substrat-Komplex vorliegt, wurde ein zweifacher Überschuss an POR-Enzym im Vergleich zur PChlide-Konzentration eingesetzt. Abbildung 33 zeigt die experimentell ermittelten Reaktionskinetiken für die Chlide-Bildung in den untersuchten POR-Mutanten. Die jeweiligen Chlide-Konzentrationen wurden aus den zum Zeitpunkt t gemessenen Absorptionsspektren nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt. An diesen Bildungskinetiken ist sofort zu erkennen, dass in allen gezeigten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp starke Aktivitätseinbußen auftreten. Die Tyrosin- und Aspartat- bzw. Lysin₂₁₆-Aspartat-Mutante besitzen die mit Abstand geringste Aktivität. Nicht mit einbezogen in Abbildung 33 sind die beiden Lysinmutanten (Lys₂₁₃ bzw. Lys₂₁₆) der POR B sowie die Aspartat-Lysin₂₁₉- und die dreifachmodifizierte Mutante der POR A, da diese überhaupt keine enzymatische Aktivität mehr aufweisen. Aus den Chlide-Bildungskinetiken wurde im Folgenden der Reaktionsumsatz entsprechend folgender Beziehung ermittelt:

$$Umsatz = \frac{[Chlide]_{max}}{[PChlide]_0} \quad (20)$$

$[Chlide]_{max}$: maximale Konzentration des Chlides

$[PChlide]_0$: Ausgangskonzentration des PChlides

Zur Berechnung der maximalen Konzentration des gebildeten Chlides wurde die experimentell gemessene Chlide-Bildungskinetik einfach exponentiell mit $y = a \cdot e^{bx} + c$ gefittet, wobei gilt: $c = [Chlide]_{max}$. Die Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit (V') unter

steady-state-Bedingungen erfolgte über:

$$V' = -\frac{d[PChlide]}{dt} = \frac{d[Chlide]}{dt} = \textit{konstant} \quad (21)$$

[PChlide]: Konzentration des PChlides

[Chlide]: Konzentration des Chlides

Die V' -Werte wurden im *steady-state*-Bereich der Zeit-Umsatzkurven über einen linearen Fit mit $y = a \cdot x + b$ aus dem jeweiligen Anstieg der Fitfunktion bestimmt.

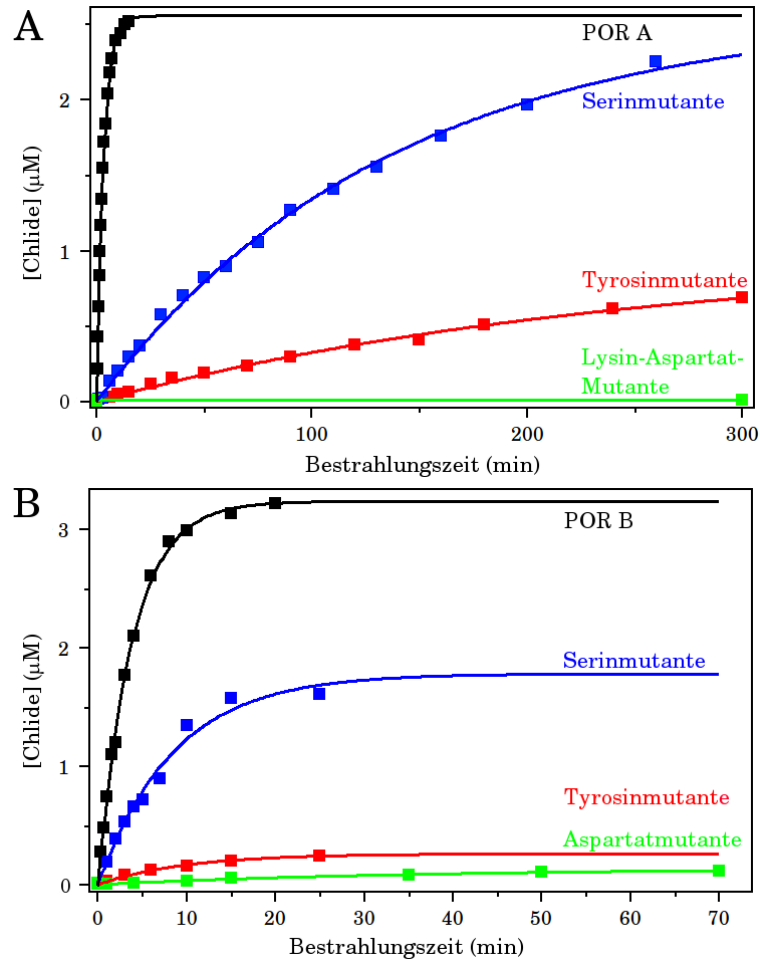


Abbildung 33: Kinetiken der Chlide-Bildung in Mutanten der POR A (A) und POR B (B) im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. ■: Wildtyp-Enzym, ■: Tyrosinmutante, ■: Serinmutante und ■: Aspartat- bzw. Lysin₂₁₆-Aspartat-Mutante. Die farblich gekennzeichneten Reaktionsverläufe zeigen die Anpassung der experimentellen Daten an die Fitfunktion $y = a \cdot e^{bx} + c$. Zu Beachten sind die unterschiedlichen Zeitbereiche bis 300 min in A und bis 70 min in B. Zusammensetzung des untersuchten POR-Komplexes: 10 μM POR, 5 μM PChlide und 100 μM NADPH im Tritonmesspuffer. Bestrahlungsintensität bei $\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$: $1,7 \frac{\text{nmol Photonen}}{\text{s} \cdot \text{cm}^2}$.

Tabelle 11 zeigt die so ermittelten Werte für den Umsatz, die Umsatzgeschwindigkeit (V')

und die relative Aktivität (A_{rel}). Abgesehen von der Serinmutante führen Mutationen in der POR A zu einer Herabsetzung des Reaktionsumsatzes. Dasselbe trifft auch auf die Mutationen in der POR B zu. Noch interessanter ist allerdings die beobachtete Verringerung in der Umsatzgeschwindigkeit und die daraus resultierende Beeinträchtigung der Enzymaktivität. So verringert sich die Umsatzgeschwindigkeit in der Serinmutante der POR A auf $\sim 3\%$ des Wertes im Wildtyp. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit der Abnahme der gemessenen Reaktionsquantenausbeute in der Serinmutante überein, die nur noch zwischen 1-3 % des Wertes für die Wildtyp POR A annimmt (siehe vorheriger Abschnitt). Eine ähnliche Abnahme in der Enzymaktivität ist auch für alle eingeführten Mutationen in der POR B festzustellen. So ist in der Serinmutante die Umsatzgeschwindigkeit bis auf $\sim 18\%$, in den anderen Mutanten bis auf 1-3 % des Wertes für den Wildtyp reduziert. Hier zeigt der direkte Vergleich zwischen den Tyrosin- und Serinmutanten, dass die modifizierte POR B gegenüber der POR A jeweils aktiver ist. Dieses Resultat steht mit den allgemein größeren Reaktionsquantenausbeuten, wie sie in Kapitel 3.2.4 für die Wildtyp POR B bestimmt wurden, im Einklang.

Tabelle 11: Umsatz, Umsatzgeschwindigkeit (V') und relative Aktivität (A_{rel}) für alle erzeugten Mutanten der POR A und POR B im Vergleich mit den Wildtyp-Enzymen. Die relative Aktivität wird definiert als $A_{rel} = \frac{V'(Mutante)}{V'(Wildtyp)}$. Zusammensetzung des untersuchten POR-Komplexes: 10 μM POR, 5 μM PChlide und 100 μM NADPH im Tritonmesspuffer.

POR-Form (Mutationen)	Umsatz	$V' \left[\frac{\mu\text{M}}{\text{min}} \right]$	A_{rel}
POR A Wildtyp	0,55	0,68	1,000
POR A (Tyr ₂₁₅ → Phe)	0,23	0,005	0,007
POR A (Ser ₂₁₈ → Ala)	0,58	0,02	0,029
POR A (Lys ₂₁₆ → Ile, Asp ₂₁₇ → Met)	-	$< 7 \cdot 10^{-6}$	$\ll 0,001$
POR A (Asp ₂₁₇ → Met, Lys ₂₁₉ → Ile)	-	-	-
POR A (Lys ₂₁₆ → Ile, Asp ₂₁₇ → Met, Ser ₂₁₈ → Ala)	-	-	-
POR B Wildtyp	0,52	0,79	1,000
POR B (Tyr ₂₁₂ → Phe)	0,05	0,02	0,025
POR B (Lys ₂₁₃ → Ile)	-	-	-
POR B (Asp ₂₁₄ → Met)	0,06	0,004	0,005
POR B (Ser ₂₁₅ → Ala)	0,24	0,14	0,177
POR B (Lys ₂₁₆ → Ile)	-	-	-

Wie im Verlauf bereits kurz erwähnt, sind in dieser Arbeit erstmals Veränderungen in der Substratbindungstasche der POR B vorgenommen worden. Die maßgebliche Beeinträchtigung der Umsatzgeschwindigkeit in der Tyrosin- und Lysin₂₁₆-Mutante lässt darauf

schließen, dass auch hier beide Aminosäuren am Protonentransfer auf das C18 der partiell reduzierten C17-C18-Doppelbindung, wie für die POR A Enzyme beschrieben, beteiligt sind. Während in der Lysinmutante die enzymatische Aktivität voll ausfällt, ist sie in der Tyrosinmutante auf $\sim 2,5\%$ des Wertes im Wildtyp reduziert.

Auffallend ist außerdem die dramatische Aktivitätserniedrigung beim Austausch des Aspartats im PChlide-Bindungsmotif der POR B. Dieser Austausch führt zu einer Verringerung der Umsatzgeschwindigkeit bis auf $\sim 0,5\%$ des Wildtypwertes. Da für die Aspartatmutante wegen ihrer äußerst geringen enzymatischen Aktivität keine Bindungskonstante ermittelt werden konnte, bleibt offen, ob das Aspartat eine Rolle bei der Einbindung des PChlides in die Substratbindungstasche übernimmt oder andererseits maßgeblich in die Photochemie eingreift. Im ersteren Fall kann es über eine Chelatisierung des Magnesium-Zentralatoms an der korrekten Positionierung des PChlides innerhalb der Substratbindungsseite beteiligt sein. Eine Bindungsdomäne, in der ein Aspartatrest für die Bindung eines Magnesium(II)-ions verantwortlich ist, wird beispielsweise für die Farnesyltransferase beschrieben. [86] Was einen Effekt auf den Mechanismus der Enzymkatalyse betrifft, so ist in der Kristallstruktur der lichtunabhängigen Protochlorophyllidreduktase ein Aspartat als funktionell wichtige Aminosäure identifiziert worden. Hier soll das Aspartat als Protonendonator bei der Reduktion des PChlides fungieren. [85] Nach bisherigen Erkenntnissen übernimmt ein Tyrosinrest diese Funktion in der lichtabhängigen NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase. Es ist aber nicht auszuschließen, dass das Aspartat in die eigentliche Photoreaktion eingreift und möglicherweise einen Beitrag zur Stabilisierung des intermediären Charge-Transfer-Zustandes (S_{ICT}) leistet.

Ähnlich offen wie für das Aspartat bleibt die Rolle des zweiten Lysins (Lys₂₁₃) für die Enzymkatalyse. Der totale Aktivitätsverlust der Lysin₂₁₃-Mutante spricht aber eher dafür, dass dem Lysin eine Schlüsselrolle bei der Schaffung einer *near-attack*-Konformation im ternären Enzym-Substrat-Komplex zukommt. Über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der positiv geladenen Lysinseitenkette und der negativ geladenen Propionsäureseitenkette im PChlide könnte so eine optimale geometrische Anordnung innerhalb des ternären POR-Komplexes geschaffen werden.

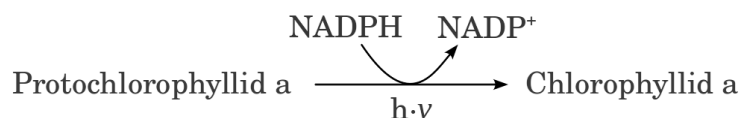
Eindeutig ist dagegen die Funktion des Serins im Substratbindungsmotiv. Da sich in der Serinmutante die Bindungskonstante gegenüber dem Wildtyp nicht ändert, ist die Verringerung in der Umsatzgeschwindigkeit nicht auf Bindungseffekte zurückzuführen. Dem Serin ist folglich eine Bedeutung im Verlauf der eigentlichen Enzymkatalyse zuzuschreiben. Auch hier erscheint es als möglich, dass das Serin über die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung oder als Komponente eines Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerkes zur Stabilisierung des intermediären Ladungstransferzustandes (S_{ICT}) beiträgt. Der Wegfall

dieses Stabilisierungseffektes in der Serinmutante könnte so auch die reduzierte Reaktionsquantenausbeute erklären.

Die Relevanz von polaren Aminosäuren in der Substratbindungstasche geht auch aus den Ergebnissen der Mehrfachmutanten hervor. Die Mutanten, in denen zwei bzw. drei polare gegen unpolare Aminosäuren ausgetauscht sind, zeigen einen (fast) vollständigen Aktivitätsverlust. Daran wird deutlich, dass ein Polaritätsverlust in der PChlide-Bindungsdomäne maßgeblich die Substratbindung und/oder Photokatalyse beeinträchtigt.

4 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen Untersuchungen zum Katalysemechanismus der NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR, EC 1.3.1.33). Die POR ist ein Schlüsselenzym der Chlorophyllbiosynthese und katalysiert in einer lichtabhängigen Reaktion die Reduktion des Protochlorophyllids (PChlide) zum Chlorophyllid (Chlide):



Im ersten Teil dieser Arbeit werden die primären Photoprozesse im nicht enzymgebundenen Substrat PChlide mittels fs-zeitaufgelöster IR-Spektroskopie mit dem Ziel analysiert, die in früheren transienten Absorptionsmessungen beobachtete Populationsdynamik strukturellen Änderungen im PChlide-Molekül zuzuordnen. In weiterführenden Experimenten wird dann die Reaktionsdynamik des an das Enzym gebundenen PChlides mit der des nicht gebundenen Substrats verglichen und daraus ein Modell für die primären Reaktionsschritte in diesem Komplex abgeleitet. Diese Arbeiten werden an dem pseudoternären PChlide-POR-NADP⁺-Komplex durchgeführt, der alle wesentlichen Prozesse im angeregten Substrat bis hin zur Bildung des Übergangszustandes widerspiegelt.

Im zweiten Teil der Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der Charakterisierung des katalytisch aktiven Zentrums in der POR. Über die Einführung von Punktmutationen werden die für den Verlauf der Enzymkatalyse essentiellen Wechselwirkungen zwischen dem Substrat und der Substratbindedomäne identifiziert. Die betreffenden Untersuchungen werden vergleichend an drei unterschiedlichen POR-Enzymen, der vorwiegend in der Deetiolierungsphase aktiven POR A aus Gerste (*Hordeum vulgare* L.), der primär im Licht aktiven POR B ebenfalls aus Gerste sowie einer POR aus *Synechocystis* (POR ss), durchgeführt. Der unterschiedliche evolutionäre Ursprung aller drei POR-Enzyme ermöglicht Aussagen über die Prinzipien der Enzymkatalyse auf verschiedenen evolutionären Entwicklungsstufen.

- Eine wesentliche Voraussetzung für die Arbeiten an der POR ist die Bereitstellung von hochaufgereinigtem PChlide. PChlide konnte aus im Dunkeln gewachsenen Haferkeimlingen (*Avena sativa* L.) durch Modifikation der in der Literatur beschriebenen Methoden nach M. Helfrich et al. bzw. W. Griffiths et al. [14] [45] und anschließender Aufreinigung über HPLC mit einer angemessenen Ausbeute von ~ 1 mg PChlide / kg Haferkeimlinge und hoher Reinheit gewonnen werden. Insbesondere gelang die Abtrennung des Protopheophorbids, das das metallfreie Analogon des PChlides ist und als unerwünschtes Nebenprodukt in der PChlide-Präparation auftritt. Aus NMR-Spektren

in Lösung ist abzuleiten, dass das PChlide als typisches Porphyrinderivat eine planare Porphyrinringstruktur aufweist.

- Die untersuchten POR-Enzyme (POR A, POR B und POR ss) konnten durch heterologe Überexpression in *E. coli*-Zellen und anschließende Aufreinigung über Affinitätschromatografie an Nickelagarose in hoher Reinheit angereichert werden. Sie zeigten nach der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes mit dem Substrat PChlide und dem Cofaktor NADPH eine jeweils hohe Enzymaktivität.
- Die Bindung des PChlides an die POR A kann über Tieftemperaturfluoreszenzmessungen bei 77 K nachgewiesen werden. Als Folge der Bindung tritt eine Rotverschiebung im Fluoreszenzmaximum ein, das sich von $\lambda_{em} = 628$ nm im nicht enzymgebundenen PChlide auf $\lambda_{em} = 641$ bzw. 645 nm im PChlide-POR-NADP⁺- bzw. PChlide-POR-NADPH-Komplex verschiebt. Eine analoge bathochrome Verschiebung tritt auch in den Fluoreszenzanregungsspektren auf.
- Zur Charakterisierung der Bindung des Substrats PChlide und des Cofaktors NADPH an die POR können auch die nach der Michaelis-Menten-Theorie bestimmten Bindungskonstanten herangezogen werden. Die für die PChlide-Bindung an die POR A ermittelte Michaeliskonstante beträgt $K_M = 3 \mu\text{M}$, für die POR B liegt dieser Wert bei $K_M = 5 \mu\text{M}$ und für die POR ss bei $K_M = 4 \mu\text{M}$. Für die NADPH-Bindung ergibt sich ein K_M -Wert von $0,7 \mu\text{M}$ für die POR A, von $1,3 \mu\text{M}$ für die POR B und von $1,2 \mu\text{M}$ für die POR ss. Wie aus diesen Werten hervorgeht, ergeben sich sowohl für die PChlide- als auch die NADPH-Bindung keine signifikanten Unterschiede in den drei POR-Enzymen. Offensichtlich weisen die POR A, POR B und POR ss jeweils die gleiche Affinität zum Substrat bzw. Cofaktor auf.
- In zeitaufgelösten IR-Messungen am ungebundenen PChlide in Lösung wurden nach Anregung mit $\lambda_{exc} = 630$ nm drei kinetische Komponenten mit Lebensdauern von $\tau_1 = 3,6$ ps, $\tau_2 = 38$ ps und $\tau_3 = 215$ ps identifiziert. Aus den dazugehörigen Decay-assoziierten Spektren geht hervor, dass der 38 ps-Zustand mit einer charakteristischen C(13')=O Streckschwingung bei 1625 cm^{-1} in den 215 ps-Zustand mit der entsprechenden C(13')=O Schwingungsmode bei $1565/1580 \text{ cm}^{-1}$ übergeht. Der 215 ps-Zustand wird in den PChlide-Grundzustand deaktiviert, die Wiederbevölkerung des Grundzustandes erfolgt aber nur zu 50%. Daraus ist abzuleiten, dass die ursprünglich angeregte Franck-Condon-Population über zwei parallele Reaktionskanäle deaktiviert wird. Über den reaktiven Kanal, der über die Besetzung des 38 ps-Zustandes führt, entsteht ein intermediärer Zustand mit einer Lebensdauer von 215 ps. Über den nichtreaktiven Kanal

erfolgt die Relaxation in den thermisch äquilibrierten S_1 -Zustand, der in einen langlebigen, im Zeitfenster der IR-Messungen nicht aufzulösenden Triplettzustand depopuliert wird. Dieses Reaktionsmodell steht in Übereinstimmung mit dem, welches auf Basis von vorausgegangenen zeitaufgelösten Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen aufgestellt wurde.

Wie aus den zeitaufgelösten IR-Messungen weiterhin resultiert, geht die Bildung des 215 ps-Zustandes mit einer dramatischen Rotverschiebung in der $C(13')=O$ Schwingungsmode einher. Diese Rotverschiebung weist auf eine Reduzierung in der Bindungsordnung der $C(13')=O$ Doppelbindung hin. Dieser Effekt steht im Einklang mit der Bildung eines intramolekularen Charge-Transfer-Zustandes im PChlide-Molekül, in dem die $C(13')=O$ Gruppe am Cyclopentanonring Elektronendichte aus dem Porphyrinringssystem abzieht. Darüber hinaus muss eine Stabilisierung des Ladungstransferzustandes über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum protischen Lösungsmittel erfolgen, um der ungewöhnlich großen Rotverschiebung in der $C(13')=O$ Schwingungsmode Rechnung zu tragen.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen am PChlide-POR- bzw. PChlide-POR-NADP⁺-Komplex zeigen bei Anregung in die Q-Bande, dass sich die Fluoreszenzlebensdauer des angeregten S_1 -Zustandes im nicht enzymgebundenen PChlide von $\tau_F = 3,4$ ns auf $\tau_F = 4,4$ ns bzw. 5,4 ns im PChlide-POR- bzw. PChlide-POR-NADP⁺-Komplex erhöht. Damit ist eine Abnahme in den nicht radiativen Konstanten von $k_{nr} = 2,8 \cdot 10^8$ s⁻¹ für das ungebundene PChlide auf $k_{nr} = 2,0 \cdot 10^8$ s⁻¹ bzw. $1,7 \cdot 10^8$ s⁻¹ in den beiden POR-Komplexen verbunden. Der dominante strahlungslose Prozess, über den der angeregte S_1 -Zustand deaktiviert wird, ist das *intersystem crossing* in den Triplettzustand. Die Abnahme in den nicht radiativen Konstanten bringt somit eine geringere Bevölkerung des Triplettzustandes in den beiden POR-Komplexen zum Ausdruck. Dieser Effekt ist für das biologische System von großer Bedeutung, da so die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Triplett-Triplett-Energietransfer verhindert wird.

In zeitaufgelösten Absorptionsmessungen am PChlide-POR- bzw. PChlide-POR-NADP⁺-Komplex lassen sich die beobachteten kinetischen Prozesse mit vier Zeitkonstanten von $\tau_1 = 3$ ps, $\tau_2 = 27$ ps, $\tau_3 = 200$ ps und $\tau_4 = 4,4$ bzw. 5,4 ns beschreiben. Das zeigt, dass dasselbe Modell wie im nicht enzymgebundenen PChlide für die Beschreibung der Reaktionsdynamik in den beiden POR-Komplexen angewendet werden kann. Allerdings ist in beiden POR-Komplexen die charakteristische Anstiegskinetik, welche die Bildung des intramolekularen Charge-Transfer-Zustandes beschreibt, bei 580

nm und nicht bei 680 nm wie im nicht enzymgebundenen Pchlde zu beobachten. Diese hypsochrome Verschiebung macht deutlich, dass der Ladungstransferzustand im aktiven Zentrum der POR eine Stabilisierung durch Wechselwirkungen mit der Proteinumgebung erfährt.

- Aus Experimenten zur Bestimmung des Abstandes zwischen enzymgebundenem NADPH und einem in der Cofaktorbindungstasche lokalisierten Tryptophanrest ergeben sich signifikante Unterschiede für die einzelnen POR-Enzyme. Während in der POR A und POR ss dieser Abstand mit $r = 13,0 \text{ \AA}$ und $r = 13,5 \text{ \AA}$ gleich groß ist, beträgt er in der POR B nur $9,7 \text{ \AA}$. Dieses Ergebnis weist auf Strukturunterschiede in der lokalen Umgebung der Cofaktorbindedomäne zwischen der POR B und der POR A bzw. POR ss hin.
- Hinsichtlich der Reaktionsquantenausbeuten für die Pchlde-Reduktion, der ein Ein-Photonenprozess zugrunde liegt, ergeben sich signifikante Unterschiede für die POR B im Vergleich zur POR A und POR ss. Die Reaktionsquantenausbeuten (Φ_r) bestimmt für die Anregung in die Soret- und Q-Bande betragen:

	POR A	POR B	POR ss
$\Phi_r(\lambda_{exc} = 407 \text{ nm})$	0,07	0,23	0,05
$\Phi_r(\lambda_{exc} = 476 \text{ nm})$	0,15	0,24	0,08
$\Phi_r(\lambda_{exc} = 647 \text{ nm})$	0,33	0,73	0,36

Die POR B weist bei allen Anregungswellenlängen eine etwa doppelt so hohe Reaktionsquantenausbeute wie die POR A und POR ss auf. Wie Bindungsstudien belegen, ist die höhere Reaktionsquantenausbeute aber nicht auf eine erhöhte Bindungskonstante für das Pchlde oder NADPH zurückzuführen. Sowohl in der POR A als auch in der POR B und POR ss ist die Reaktionsquantenausbeute bei Anregung in die Q-Bande ($\lambda_{exc} = 647 \text{ nm}$) größer als bei Anregung in die Soretbande ($\lambda_{exc} = 407$ bzw. 476 nm). Damit verbunden ist eine Ab- bzw. Zunahme in der Bevölkerung des Triplettzustandes. Wie aus transienten Absorptionsmessungen hervorgeht, wird bei Anregung in die Q-Bande im Gegensatz zur Anregung in die Soretbande der Triplettzustand weniger stark bevölkert. Das Lichtspektrum des Schattens, den Pflanzen auf benachbarte Pflanzen werfen, besitzt einen sehr hohen Anteil an dunkelrotem Licht. Da die meisten Pflanzen im Verbund anderer Pflanzen wachsen, steht Ihnen bevorzugt nur diese Lichtqualität zur Verfügung. Aufgrund dieses Sachverhalts ist die höhere Effizienz der POR-katalysierten Reaktion bei Anregung im roten Spektralbereich von großer Bedeutung in der Natur, da sie eine hinreichende Chlorophyllsynthese auch in Schattenpflanzen gewährleistet.

- In der POR A, POR B und POR ss wird die Substratbindungsseite von dem Penta-peptid Tyrosin – Lysin₁ - Aspartat - Serin – Lysin₂ gebildet. Die schrittweise Substitution dieser polaren durch unpolare Aminosäuren in *site-directed* Mutageneseexperimenten führt zu den im Folgenden beschriebenen Ergebnissen. In den Tyrosin- und Lysin₁-Mutanten ist die enzymatische Aktivität dramatisch reduziert bzw. vollständig gehemmt. Dies bestätigt die in der Literatur postulierte Funktion dieser beiden Aminosäuren für den Katalysemechanismus. Danach sind beide am Protonentransfer auf die partiell reduzierte C17-C18-Doppelbindung im PChlide beteiligt. In der Serinmutante ist die Reaktionsquantenausbeute ebenfalls dramatisch herabgesetzt. Sie beträgt nur noch 1-3 % des Wertes im Wildtyp. Allerdings ist die Bindungskonstante für das PChlide gegenüber dem Wildtyp unverändert. Dieser Sachverhalt macht deutlich, dass auch dem Serin eine entscheidende Rolle bei der Enzymkatalyse zuzuschreiben ist. Diese könnte in einer Stabilisierung des intramolekularen Charge-Transfer-Zustandes, der als Intermediat bei der Enzymkatalyse auftritt und möglicherweise den Übergangszustand repräsentiert, liegen. Zur Stabilisierung dieses Zustandes kann die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen bzw. eines Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerkes unter Beteiligung des Serins beitragen. Außerdem ist auch in den Aspartat- und Lysin₂-Mutanten die enzymatische Aktivität stark gehemmt. Da aufgrund der äußerst geringen verbleibenden enzymatischen Aktivität keine Bindungskonstanten für das PChlide ermittelt werden können, bleibt offen, ob diese beiden Aminosäuren die Bindung des Substrats oder die eigentliche Enzymkatalyse beeinflussen.
- Die POR ss aus Cyanobakterien (*Synechocystis*) zeigt im Vergleich zur POR A und POR B aus höheren Pflanzen (*Hordeum vulgare* L.) die größte Abweichung in ihrer Primärstruktur. Allerdings weist sie im Vergleich zur POR A zum einen keine Änderung in der Cofaktorbindingdomäne hinsichtlich des Abstands zwischen gebundenem NADPH und einem unmittelbar benachbarten Tryptophanrest und zum anderen eine ähnliche Reaktionsquantenausbeute für die PChlide-Reduktion auf. Eine vergleichbare Abhängigkeit der Reaktionsquantenausbeute von der Bestrahlungswellenlänge ist auch wie bei den POR-Enzymen aus Gerste bei der POR ss zu beobachten. Des Weiteren zeigt die POR ss im Vergleich zur POR A und POR B keine signifikanten Unterschiede in der Bindungskonstante für das PChlide und NADPH. Aufgrund dieser Befunde ist anzunehmen, dass die POR aus Cyanobakterien als quasi evolutionärer Vorgänger für die POR-Enzyme aus den angiospermen Pflanzen zu betrachten ist.

Summary

Light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR) catalyses the photoreduction of protochlorophyllide to chlorophyllide in chlorophyll biosynthetic pathway. In this NADPH-dependent reaction a proton and a hydride are transferred to C17-C18 double bond of protochlorophyllide. In all organisms, which are able to carry out oxygenic photosynthesis, different POR enzymes exist. In angiosperms three different isoenzymes, POR A, POR B and POR C, are known. Additionally, cyanobacteria make use of POR, which allows the comparison of POR enzymes related to evolutionary aspects.

The intramolecular charge transfer state of protochlorophyllide is assumed to play an important role during photoreduction. It could be shown that formation of this state accompanies a red shift of the C(13')=O carbonyl stretching mode of the isocyclic fifth ring of protochlorophyllide, indicating an increase in the carbonyl bond length which is possibly evoked by hydrogen-bonding interactions.

Protein sites in the catalytic pocket handicap the formation of the triplet state of protochlorophyllide, which stands in direct competition with the formation of the intramolecular charge transfer state. Moreover, a strong blue shift in the excited-state absorption of the intramolecular charge transfer state was observed, indicating a state stabilization by the protein sites. This stabilization could be due to hydrogen-bonding interactions, too.

Point mutations in the binding pocket of protochlorophyllide (tyrosine - lysine - aspartate - serine - lysine) demonstrate a radical reduction of the enzymatic activity for the substitution of each amino acid. That is, the possibility to form such hydrogen bonds is given for all amino acids in the binding pocket of protochlorophyllide.

Comparison of POR A of barley with POR ss of the cyanobacterium *Synechocystis* reveals no significant differences in the three-dimensional structure close to the binding pocket of NADPH, neither in the binding of protochlorophyllide and NADPH nor in the catalytic activity, indicating no significant evolutionary progress over the last two to three billion years.

However, a comparison of the two isoenzymes POR A and POR B of barley manifests discrepancies. The tertiary structure around the NADPH binding domain differs, but both enzymes show the same affinity to NADPH and alternatively to protochlorophyllide. POR B is nearly twice as efficient as POR A, possibly explainable by a different three-dimensional structure.

All three enzymes show a higher efficiency after excitation with red light than with blue light. The result of this dependency on the excitation wavelength is a reduced population of the triplet state after excitation with red light.

Abkürzungen

A, C, G, T	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin
Ala	Alanin
Asp	Aspartat
bp	Basenpaare
Chlide	Chlorophyllid
DAS	Decay-assoziertes Spektrum
DC	Dünnschichtchromatografie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
Gly	Glycin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICT	Intramolekularer Charge-Transfer
Ile	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
Lys	Lysin
MALDI/TOF	Matrix assisted Laser Desorption/Ionization / Time of Flight
MeOH	Methanol
Met	Methionin
MID-IR	mittleres Infrarot
MS	Massenspektroskopie
NADPH	Nikotinamid-Adenin Dinukleotidphosphat, reduziert
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD	optische Dichte
PChlide	Protochlorophyllid
PCR	Polymerase Chain Reaction
Phe	Phenylalanin
pKa	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
POR	NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Ser	Serin

taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
UV/VIS	Ultraviolett/visible

Literatur

- [1] D. W. Bollivar. Recent advances in chlorophyll biosynthesis. *Photosynth. Res.*, 89:1–22, 2006.
- [2] C. Reinbothe, M. El Bakkouri, F. Buhr, N. Muraki, J. Nomata, G. Kurisu, Y. Fujita, and S. Reinbothe. Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. *Trends in Plant Science*, 15:614–624, 2010.
- [3] C. Kim, H. Ham, and K. Apel. Multiplicity of different cell- and organ-specific import routes for the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductases A and B in plastids of Arabidopsis seedlings. *Plant J.*, 42:329–340, 2005.
- [4] T. P. Begley and H. Young. Protochlorophyllide Reductase. 1. Determination of the Regiochemistry and the Stereochemistry of the Reduction of Protochlorophyllide to Chlorophyllide. *J. Am. Chem. Soc.*, 111:3096–3098, 1989.
- [5] V. Valera, M. Fung, A. N. Wessler, and W. R. Richards. Synthesis of 4R- and 4S-tritium labeled NADPH for the determination of the coenzyme stereospecificity of NADPH:Protochlorophyllide oxidoreductase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 148:515–520, 1987.
- [6] N. Lebedev, O. Karginova, W. McIvor, and M. P. Timko. Tyr275 and Lys279 Stabilize NADPH within the Catalytic Site of NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductase and Are Involved in the Formation of the Enzyme Photoactive State. *Biochemistry*, 40:12562–12574, 2001.
- [7] D. J. Heyes and C. N. Hunter. Site-directed mutagenesis of Tyr-189 and Lys-193 in NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from *Synechocystis*. *Biochem. Soc. Trans.*, 30:601–604, 2002.
- [8] B. R. K. Menon, J. P. Waltho, N. S. Scrutton, and D. J. Heyes. Cryogenic and Laser Photoexcitation Studies Identify Multiple Roles for Active Site Residues in the Light-driven Enzyme Protochlorophyllide Oxidoreductase. *J. Biol. Chem.*, 284:18160–18166, 2009.
- [9] H. M. Wilks and M. P. Timko. A light-dependent complementation system for analysis of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase: Identification and mutagenesis of two conserved residues that are essential for enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:724–728, 1995.

- [10] H. E. Townley, R. B. Sessions, A. R. Clarke, T. R. Dafforn, and W. T. Griffiths. Protochlorophyllide Oxidoreductase: A Homology Model Examined by Site-Directed Mutagenesis. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 44:329–335, 2001.
- [11] C. Reinbothe, F. Buhr, S. Bartsch, C. Desvignes, F. Quigley, H. Pesey, and S. Reinbothe. In vitro-mutagenesis of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase B: two distinctive protochlorophyllide binding sites participate in enzyme catalysis and assembly. *Mol. Gen. Genomics*, 275:540–552, 2006.
- [12] F. Buhr, M. El Bakkouri, O. Valdez, S. Pollmann, N. Lebedev, S. Reinbothe, and C. Reinbothe. Photoprotective role of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:12629–12634, 2008.
- [13] B. R. K. Menon, P. A. Davison, C. N. Hunter, N. S. Scrutton, and D. J. Heyes. Mutagenesis Alters the Catalytic Mechanism of the Light-driven Enzyme Protochlorophyllide Oxidoreductase. *J. Biol. Chem.*, 285:2113–2119, 2010.
- [14] W. T. Griffiths. Substrate-Specificity Studies on Protochlorophyllide Reductase in Barley (*Hordeum vulgare*) Etioplast Membranes. *Biochem. J.*, 186:267–278, 1980.
- [15] H. Klement, M. Helfrich, U. Oster, S. Schoch, and W. Rüdiger. Pigment-free NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from *Avena sativa* L. *Eur. J. Biochem.*, 265:862–874, 1999.
- [16] H. Klement. *NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR): Untersuchungen zu einem „Schlüsselenzym“ der Chlorophyll-Biosynthese in Angiospermen*. PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2000.
- [17] W. Rüdiger, S. Böhm, M. Helfrich, S. Schulz, and S. Schoch. Enzymes of the Last Step of Chlorophyll Biosynthesis: Modification of the Substrate Structure Helps To Understand the Topology of the Active Centers. *Biochemistry*, 44:10864–10872, 2005.
- [18] K. Apel, H. J. Santel, T. E. Redlinger, and H. Falk. The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.). Isolation and characterization of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. *Eur. J. Biochem.*, 111:251–258, 1980.
- [19] M. E. Baker. Protochlorophyllide reductase is homologous to human carbonyl reductase and pig 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem. J.*, 300:605–607, 1994.
- [20] S. J. Birve, E. Selstam, and L. B.-Å. Johansson. Secondary structure of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase examined by circular dichroism and prediction methods. *Biochem. J.*, 317:549–555, 1996.

- [21] C. Reinbothe, A. Lepinat, M. Deckers, E. Beck, and S. Reinbothe. The Extra Loop Distinguishing POR from the Structurally Related Short-chain Alcohol Dehydrogenases Is Dispensable for Pigment Binding but Needed for the Assembly of Light-harvesting POR-Protochlorophyllide Complex. *J. Biol. Chem.*, 278:816–822, 2003.
- [22] W. T. Griffiths. Reconstitution of Chlorophyllide Formation by Isolated Etioplast Membranes. *Biochem. J.*, 174:681–692, 1978.
- [23] F. Franck, U. Sperling, G. Frick, B. Pochert, B. van Cleve, K. Apel, and G. A. Armstrong. Regulation of Etioplast Pigment-Protein Complexes, Inner Membrane Architecture, and Protochlorophyllide a Chemical Heterogeneity by Light-Dependent NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductases A and B. *Plant Physiol*, 124:1678–1696, 2000.
- [24] G. K. Pattanayak and B. C. Tripathy. Catalytic Function of a Novel Protein Protochlorophyllide Oxidoreductase C of *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 291:921–924, 2002.
- [25] T. Masuda, N. Fusada, N. Oosawa, K. Takamatsu, Y. Y. Yamamoto, M. Ohto, K. Nakamura, K. Goto, D. Shibata, Y. Shirano, H. Hayashi, T. Kato, S. Tabata, H. Shimada, H. Ohta, and K. Takamiya. Functional analysis of isoforms of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR), PORB and PORC, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 44:963–974, 2003.
- [26] T. N. Paddock, M. E. Mason, D. F. Lima, and G. A. Armstrong. *Arabidopsis* protochlorophyllide oxidoreductase A (PORA) restores bulk chlorophyll synthesis and normal development to a *porB porC* double mutant. *Plant Mol. Biol.*, 72:445–457, 2010.
- [27] H. Holtorf, S. Reinbothe, C. Reinbothe, B. Bereza, and K. Apel. Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:3254–3258, 1995.
- [28] G. A. Armstrong, S. Runge, G. Frick, U. Sperling, and K. Apel. Identification of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A and B: a branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 108:1505–1517, 1995.
- [29] S. Runge, U. Sperling, G. Frick, K. Apel, and G. A. Armstrong. Distinct roles for light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases (POR) A and B during greening in higher plants. *The Plant Journal*, 9:513–523, 1996.

- [30] R. R. Wise and J. K. Hooper. *The Structure and Function of Plastids (Volume 23) in Advances in Photosynthesis and Respiration*, page 37. Springer Netherlands, 2006.
- [31] F. Buhr. *Untersuchung und Charakterisierung des Lichtsammelkomplexes (LHPP) in etiolierten Pflanzen*. PhD thesis, Universität Bayreuth, 2006.
- [32] S. Reinbothe, S. Pollmann, A. Springer, R. J. James, G. Tichtinsky, and C. Reinbothe. A role of Toc33 in the protochlorophyllide-dependent plastid import pathway of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR) A. *The Plant Journal*, 42:1–12, 2005.
- [33] C. Reinbothe, F. Buhr, S. Pollmann, and S. Reinbothe. In Vitro Reconstitution of Light-harvesting POR-Protochlorophyllide Complex with Protochlorophyllides a and b. *J. Biol. Chem.*, 278:807–815, 2003.
- [34] C. Reinbothe, N. Lebedev, and S. Reinbothe. A protochlorophyllide light-harvesting complex involved in de-etiolation of higher plants. *Nature*, 397:80–84, 1999.
- [35] A. H. Zewail. Femtochemie: Studium der Dynamik der chemischen Bindung auf atomarer Skala mit Hilfe ultrakurzer Laserpulse (Nobel-Aufsatz). *Angew. Chem.*, 112:2688–2738, 2000.
- [36] J. Aßmann, M. Kling, and B. Abel. Echtzeit-Beobachtung photoinduzierter Chemie und molekularen Energietransfers in Lösung. *Angew. Chem.*, 115:2326–2347, 2003.
- [37] D. J. Heyes, C. N. Hunter, I. H. M. van Stokkum, R. van Grondelle, and M. L. Groot. Ultrafast enzymatic reaction dynamics in protochlorophyllide oxidoreductase. *Nature Structural Biology*, 10:491–492, 2003.
- [38] O. A. Sytina, D. J. Heyes, C. N. Hunter, M. T. Alexandre, I. H. M. van Stokkum, R. van Grondelle, and M. L. Groot. Conformational changes in an ultrafast light-driven enzyme determine catalytic activity. *Nature*, 456:1001–1004, 2008.
- [39] D. J. Heyes, A. V. Ruban, and C. N. Hunter. Protochlorophyllide Oxidoreductase: “Dark“ Reactions of a Light-Driven Enzyme. *Biochemistry*, 42:523–528, 2003.
- [40] D. J. Heyes and C. N. Hunter. Identification and Characterization of the Product Release Steps within the Catalytic Cycle of Protochlorophyllide Oxidoreductase. *Biochemistry*, 43:8265–8271, 2004.
- [41] D. J. Heyes and C. N. Hunter. Making light work of enzyme catalysis: protochlorophyllide oxidoreductase. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 30:642–649, 2005.

- [42] D. J. Heyes, M. Sakuma, and N. S. Scrutton. Laser Excitation Studies of the Product Release Steps in the Catalytic Cycle of the Light-driven Enzyme, Protochlorophyllide Oxidoreductase. *J. Biol. Chem.*, 282:32015–32020, 2007.
- [43] D. J. Heyes, B. R. K. Menon, M. Sakuma, and N. S. Scrutton. Conformational Events during Ternary Enzyme-Substrate Complex Formation Are Rate Limiting in the Catalytic Cycle of the Light-Driven Enzyme Protochlorophyllide Oxidoreductase. *Biochemistry*, 47:10991–10998, 2008.
- [44] D. J. Heyes, P. Heathcote, S. E. J. Rigby, M. A. Palacios, R. van Grondelle, and C. N. Hunter. The First Catalytic Step of the Light-driven Enzyme Protochlorophyllide Oxidoreductase Proceeds via a Charge Transfer Complex. *J. Biol. Chem.*, 281:26847–26853, 2006.
- [45] M. Helfrich, S. Schoch, W. Schäfer, M. Ryberg, and W. Rüdiger. Absolute Configuration of Protochlorophyllide a and Substrate Specificity of NADPHProtochlorophyllide Oxidoreductase. *J. Am. Chem. Soc.*, 118:2606–2611, 1996.
- [46] C. Houssier and K. Sauer. Circular dichroism and magnetic circular dichroism of the chlorophyll and protochlorophyll pigments. *J. Am. Chem. Soc.*, 92:779–791, 1970.
- [47] R. Siebert, D. Akimov, M. Schmitt, A. Winter, U. S. Schubert, B. Dietzek, and J. Popp. Spectroscopic Investigation of the Ultrafast Photoinduced Dynamics in π -Conjugated Terpyridines. *ChemPhysChem*, 10:910–919, 2009.
- [48] B. Dietzek, W. Kiefer, A. Yartsev, V. Sundström, P. Schellenberg, P. Griggaravicius, G. Hermann, J. Popp, and M. Schmitt. The Excited-State Chemistry of Protochlorophyllide a: A Time-Resolved Fluorescence Study. *ChemPhysChem*, 7:1727–1733, 2006.
- [49] M. Gouterman. Spectra of porphyrins. *J. molecular Spectroscopy*, 6:138–163, 1961.
- [50] M. Gouterman, G. H. Wagniere, and L. C. Snyder. Spectra of porphyrins: Part II. Four orbital model. *J. molecular Spectroscopy*, 11:108–127, 1963.
- [51] O. A. Sytina, I. H. M. van Stokkum, D. J. Heyes, C. N. Hunter, R. van Grondelle, and M. L. Groot. Protochlorophyllide Excited-State Dynamics in Organic Solvents Studied by Time-Resolved Visible and Mid-Infrared Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, 114:4335–4344, 2010.

- [52] K. M. Kadish, K. M. Smith, and R. Guillard. *The Porphyrin Handbook Vol. 3. Inorganic, Organometallic and Coordination Chemistry*, pages 3–68. Academic Press San Diego, 2000.
- [53] B. Dietzek, W. Kiefer, G. Hermann, J. Popp, and M. Schmitt. Solvent Effects on the Excited-State Processes of Protochlorophyllide: A Femtosecond Time-Resolved Absorption Study. *J. Phys. Chem. B*, 110:4399–4406, 2006.
- [54] B. Dietzek, S. Tschierlei, G. Hermann, A. Yartsev, T. Pascher, V. Sundström, M. Schmitt, and J. Popp. Protochlorophyllide a: A Comprehensive Photophysical Picture. *ChemPhysChem*, 10:144–150, 2009.
- [55] B. Dietzek, S. Tschierlei, R. Hanf, S. Seidel, A. Yartsev, M. Schmitt, G. Hermann, and J. Popp. Dynamics of charge separation in the excited-state chemistry of protochlorophyllide. *Chem. Phys. Letters*, 492:157–163, 2010.
- [56] J. A. Bautista, R. E. Connors, B. B. Raju, R. G. Hiller, F. P. Sharples, D. Gosztola, M. R. Wasielewski, and H. A. Frank. Excited State Properties of Peridinin: Observation of a Solvent Dependence of the Lowest Excited Singlet State Lifetime and Spectral Behavior Unique among Carotenoids. *J. Phys. Chem. B*, 103:8751–8758, 1999.
- [57] H. A. Frank, J. A. Bautista, J. Josue, Z. Pendon, R. G. Hiller, F. P. Sharples, D. Gosztola, and M. R. Wasielewski. Effect of the Solvent Environment on the Spectroscopic Properties and Dynamics of the Lowest Excited States of Carotenoids. *J. Phys. Chem. B*, 104:4569–4577, 2000.
- [58] B. Dietzek, R. Maksimenka, W. Kiefer, G. Hermann, J. Popp, and M. Schmitt. The excited-state dynamics of magnesium octaethylporphyrin studied by femtosecond time-resolved four-wave-mixing. *Chem. Phys. Lett.*, 415:94–99, 2005.
- [59] J. D. Spikes and J. C. Bommer. Chlorophyll and related pigments as photosensitizers in biology and medicine. In H. Scheer, editor, *Chlorophylls*, pages 1181–1204. CRC Press, Boca Raton, 1991.
- [60] J. L. Retsek, S. Gentemann, C. J. Medforth, K. M. Smith, V. S. Chirvony, J. Fajer, and D. Holten. Photoinduced Evolution on the Conformational Landscape of Nonplanar Dodecaphenylporphyrin: Picosecond Relaxation Dynamics in the $^1(\pi, \pi^*)$ Excited State. *J. Phys. Chem. B*, 104:6690–6693, 2000.

- [61] J. S. Baskin, H.-Z. Yu, and A. H. Zewail. Ultrafast Dynamics of Porphyrins in the Condensed Phase: I. Free Base Tetraphenylporphyrin. *J. Phys. Chem. A*, 106:9837–9844, 2002.
- [62] W.G. Mäntele, A. M. Wollenweber, E. Navedryk, and J. Breton. Infrared spectro-electrochemistry of bacteriochlorophylls and bacteriopheophytins: Implication for the binding of the pigments in the reaction center photosynthetic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8468–8472, 1988.
- [63] P. Hamm, M. Zurek, W. Mäntele, M. Meyer, H. Scheer, and W. Zinth. Femtosecond infrared spectroscopy of reaction centers from *Rhodobacter spaeroides* between 1000 and 1800 cm^{-1} . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:1826–1830, 1995.
- [64] M. Hesse, H. Meier, and B. Zeeh. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, pages 49, 54. Thieme, Stuttgart, 2005.
- [65] D. J. Heyes, A. V. Ruban, H. M. Wilks, and C. N. Hunter. Enzymology below 200 K: The kinetics and thermodynamics of the photochemistry catalyzed by protochlorophyllide oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:11145–11150, 2002.
- [66] Z. Katona, A. Grofcsik, P. Baranyai, I. Bitter, G. Grabner, M. Kubinyi, and T. Vidóczy. Triplet state spectroscopic studies on some 5,10,15,20-tetrakis(methoxyphenyl)porphyrins. *J. Mol. Struct.*, 450:41–45, 1998.
- [67] M. Pineiro, A. L. Carvalho, M. M. Pereira, A. M. d’A. R. Gonsalves, L. G. Arnaut, and S. J. Formosinho. Photoacoustic Measurements of Porphyrin Triplet-State Quantum Yields and Singlet-Oxygen Efficiencies. *Chem. Eur. J.*, 4:2299–2307, 1998.
- [68] P. Schopfer and A. Brennicke. *Pflanzenphysiologie*, pages 601–605. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010.
- [69] C. P. Hickman, L. S. Roberts, A. Larson, H. l’Anson, and D. J. Eisenhour. *Zoologie*, page 47. Pearson Studium, München, 2008.
- [70] L. O. Björn and Govindjee. The evolution of photosynthesis and chloroplasts. *Current Science*, 96:1466–1474, 2009.
- [71] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, pages 445–450. Springer, Berlin, 2006.
- [72] D. L. Nelson and M. M. Cox. *Lehninger Biochemie*, pages 273–278. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2005.

- [73] M. J. McFarlane, C. N. Hunter, and D. J. Heyes. Kinetic characterisation of the light-driven protochlorophyllide oxidoreductase (POR) from *Thermosynechococcus elongatus*. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 4:1055–1059, 2005.
- [74] D. J. Heyes, G. E. M. Martin, R. J. Reid, C. N. Hunter, and H. M. Wilks. NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from *Synechocystis*: overexpression, purification and preliminary characterisation. *FEBS Letters*, 483:47–51, 2000.
- [75] G. E. M. Martin, M. P. Timko, and H. M. Wilks. Purification and kinetic analysis of pea (*Pisum sativum* L.) NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase expressed as a fusion with maltose-binding protein in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, 325:139–145, 1997.
- [76] W. T. Griffiths, T. McHugh, and R. E. Blankenship. The light intensity dependence of protochlorophyllide photoconversion and its significance to the catalytic mechanism of protochlorophyllide reductase. *FEBS Letters*, 398:235–238, 1996.
- [77] B. Schoefs and F. Franck. The photoenzymatic cycle of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase in primary bean leaves (*Phaseolus vulgaris*) during the first days of photoperiodic growth. *Photosynth. Res.*, 96:15–26, 2008.
- [78] A. N. Glöß. *Photodissoziationsspektroskopie und Photoelektronenspektroskopie an massenselektierten Ionen in der Gasphase*. PhD thesis, Universität Karlsruhe (TH), 2007.
- [79] J. Polster. *Reaktionskinetische Auswertung spektroskopischer Meßdaten*, pages 33–52. Vieweg, Braunschweig, 1995.
- [80] P. H. Raven, R. F. Evert, and S. E. Eichhorn. *Biologie der Pflanzen*, pages 138–140. Gruyter, Berlin, 2006.
- [81] M. J. Ingrouille and B. Eddie. *Plants: Diversity and Evolution*, pages 284–285. Cambridge University Press, 2006.
- [82] R. Wagner, K. Bräutigam, and T. Pfannschmidt. Die Photosynthese - Ein Umweltsensor, der Gene reguliert. *Bioforum*, 3:48–50, 2006.
- [83] B. Klose. *Meteorologie: Eine interdisziplinäre Einführung in die Physik der Atmosphäre*, pages 170–173. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2008.

- [84] O. F. Nielsen and A. Kahn. Kinetics and Quantum Yield of Photoconversion of Protochlorophyll(id) to Chlorophyll(ide). *Biochimica et Biophysica Acta*, 292:117–129, 1973.
- [85] N. Muraki, J. Nomata, K. Ebata, T. Mizoguchi, T. Shiba, H. Tamiaki, G. Kurisu, and Y. Fujita. X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase. *Nature*, 465:110–114, 2010.
- [86] J. S. Pickett, K. E. Bowers, and C. A. Fierke. Mutagenesis Studies of Protein Farnesyltransferase Implicate Aspartate β 352 as a Magnesium Ligand. *J. Biol. Chem.*, 278:51243–51250, 2003.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zu der Verwirklichung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Gudrun Hermann für die intensive Betreuung, die fortdauernde Unterstützung und die vielen fachbezogenen, aber auch nichtwissenschaftlichen Gespräche. Ich danke Herrn Prof. Dr. Thorsten Heinzel für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit am Institut für Biochemie und Biophysik ebenso der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich bei Robert Hanf, PD Dr. Benjamin Dietzek, apl. Prof. Dr. Michael Schmitt und Prof. Dr. Jürgen Popp vom Institut für Physikalische Chemie bzw. Institut für photonische Technologien Jena und bei Miriam Colindres-Rojas und Prof. Dr. Rolf Diller vom Fachbereich Physik der Technischen Universität Kaiserslautern für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke ebenfalls Frau Heidrun Müller vom Institut für Physikalische Chemie und Frau Dr. Rita Büchler vom Max Planck Institut für chemische Ökologie für die Möglichkeit und die Hilfe bei der Durchführung der Fluoreszenzmessungen, außerdem Herrn Dr. Oliver Ohlenschläger und Herrn Dr. Matthias Görlach vom Leibniz-Institut für Altersforschung für die Durchführung der NMR-Spektroskopie.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Genetik, im Besonderen Frau Dr. Hannelore Simon für die Möglichkeit und die Hilfe zur Durchführung der molekulargenetischen Methoden, sowie Matthias Gimpel aus der Arbeitsgruppe Bakteriengenetik für die Hilfe bei genetischen Fragestellungen.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Biophysik, insbesondere bei der Arbeitsgruppe Peptidchemie für die Unterstützung und die Möglichkeit der Nutzung der HPLC-Anlagen.

Ein großer Dank geht an meine Familie, vor allem an meine Eltern und meinen Mann für den Rückhalt und das Verständnis während der gesamten Promotionsphase.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Ferner erkläre ich, dass die vorgelegte Arbeit von mir selbstständig angefertigt, keine Textabschnitte Dritter ohne Kennzeichnung übernommen und alle benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen angegeben wurden.

Sowohl bei der Auswahl und Auswertung des Materials als auch bei der Herstellung des Manuskripts hat mir keiner geholfen.

Ebenfalls wurde keine Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Des Weiteren erkläre ich, dass kein Dritter unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten von mir erhalten hat, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Die vorgelegte Arbeit wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder die vorgelegte noch eine in weiten Teilen ähnliche oder andere Arbeit an einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe. Ebenfalls habe ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium an einer anderen Hochschule beantragt.

Jena, den 5. Juli 2011

Sonja Fey

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sonja Fey, geb. Seidel
Geburtsdatum: 04.11.1982
Geburtsort: Eschwege
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1989 - 1993 Grundschole in Wölfershausen
1993 - 1999 Mittelstufe an der Werratalschule in Heringen
1999 - 2002 Abitur an der Werratalschule in Heringen

Hochschulausbildung

10/2002 - 09/2007 Chemiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena mit dem Abschluss Diplom-Chemikerin. Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel „Rutheniumkomplexe zur Modifizierung und Erkennung von DNA“ am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Chemisch-geowissenschaftlichen Fakultät an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

seit 10/2007 Promotion am Institut für Biochemie und Biophysik der Biologisch-pharmazeutischen Fakultät an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Jena, den 5. Juli 2011

Sonja Fey